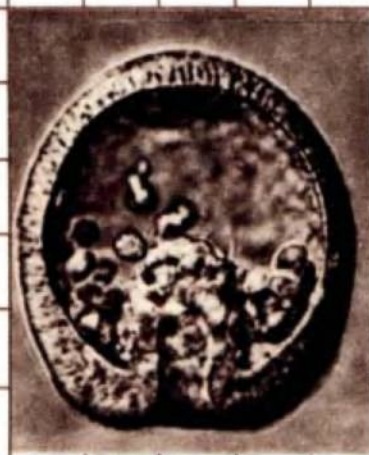


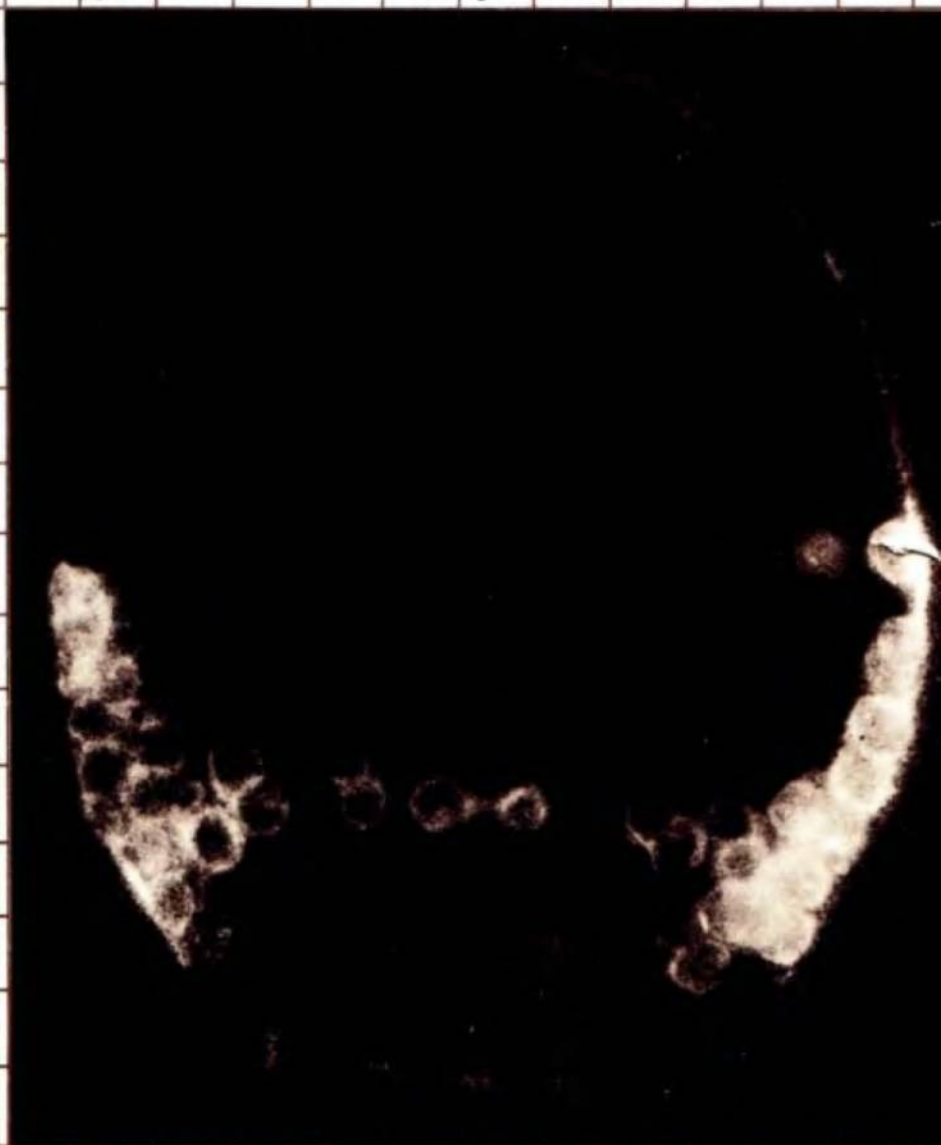
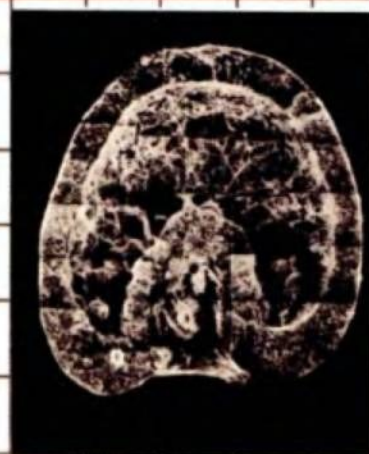
С. Гилберт

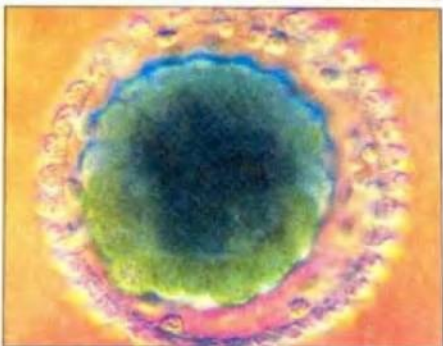
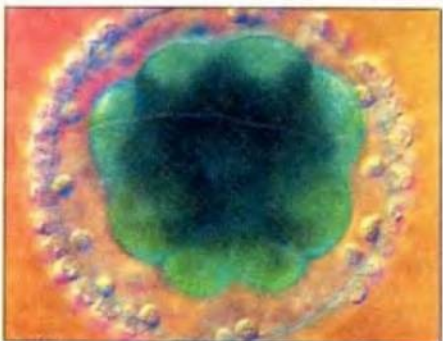
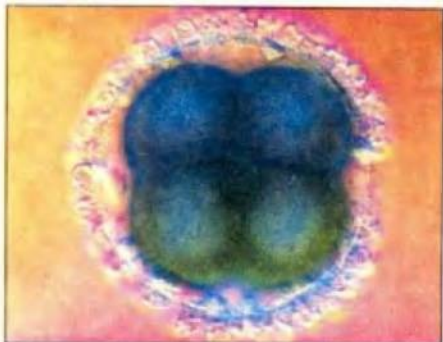
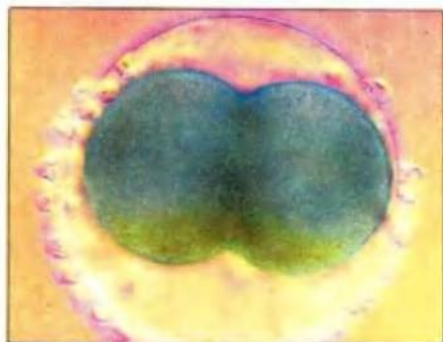
БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ

Издательство «Мир» Москва



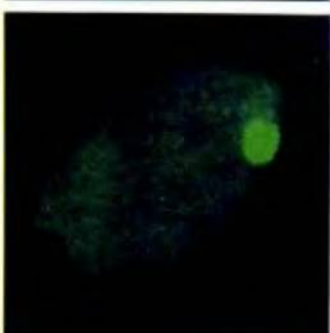
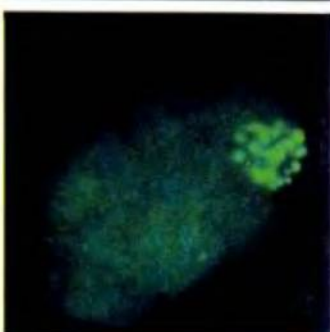
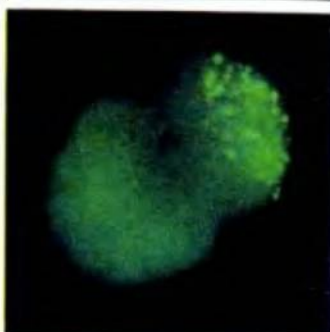
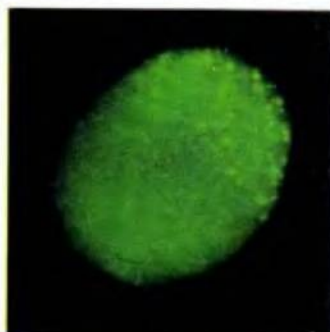
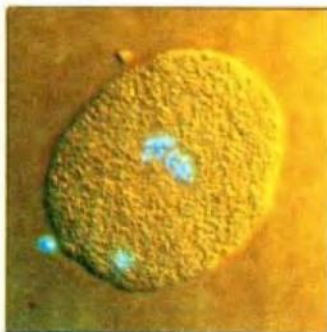
2





Прогрессивная цитоплазматическая локализация

Зигота *Caenorhabditis elegans* содержит особые гранулы (Р-гранулы), случайно рассеянные в цитоплазме. Во время миграции пронуклеусов эти гранулы локализуются в заднем отделе зиготы, попадая в результате первого деления дробления только в бластомер Р1. При последующих делениях дробления Р-гранулы до начала митоза рассеиваются по всей цитоплазме, но во время митоза вновь собираются в заднем отделе клетки. В конце концов Р-гранулы оказываются в бластомере Р4, который впоследствии дает начало гаметам. *Левая колонка:* клетки окрашены по методике, позволяющей выявлять ядра; *правая колонка:* окрашивание клеток для выявления Р-гранул. Глава 7. (Фотографии с любезного разрешения S. Strome.)



†

Цитоплазматическая локализация у зародышей оболочников

В процессе дробления цитоплазма яйца разделяется на отдельные клетки. В области желтого серпа у зародышей *Styela* локализуется небольшая группа клеток, которая даст начало мускулатуре личинки. Главы 3 и 7. (Фотографии 2-, 4-, 16- и 64-клеточных зародышей любезно предоставлены J. R. Whittaker.)

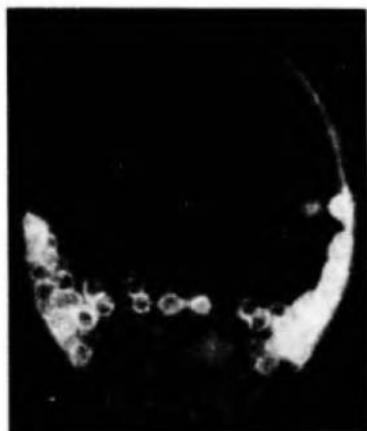
БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ

Developmental Biology

Second Edition

SCOTT F. GILBERT

SWARTHMORE COLLEGE



Sinauer Associates, Inc. • Publishers
Sunderland, Massachusetts

С. Гилберт

БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ

В 3-х томах

Перевод с английского
д-ра биол. наук Г. М. Игнатьевой,
д-ра биол. наук В. С. Михайлова

под редакцией
д-ра биол. наук С. Г. Васецкого,
д-ра биол. наук Т. А. Детлаф

2



«Мир» Москва

1994

ББК 28.0
Г47
УДК 57

Гилберт С.
Г47 Биология развития: В 3-х т. Т. 2: Пер. с англ. – М.: Мир,
1994. – 235 с., ил.

ISBN 5-03-001832-8

Фундаментальное учебное и справочное пособие по относительно новой, быстро развивающейся дисциплине – биологии развития. На русском языке выходит в 3-х томах. Второй том посвящен вопросам клеточной дифференцировки.

Для эмбриологов, молекулярных биологов, генетиков, цитологов и других специалистов-биологов, а также студентов биологических факультетов.

ББК 28.0

Редакция литературы по биологии

Издание выпущено в счет дотации, выделенной комитетом РФ по печати

ISBN 5-03-001832-8 (русск.)
ISBN 5-03-001830-1
ISBN 0-87893-248-8 (англ.)

© 1988 by Sinauer Associates, Inc.
© перевод на русский язык,
Игнатъева Г. М., Михайлов В. С., 1994

Механизмы клеточной дифференцировки

Глава 7

Детерминация посредством цитоплазматической спецификации

Я считаю вероятным, что в зародышевых клетках существуют тонкие внутренние различия, которые предопределяют их последующую трансформацию в детерминированные структуры; не различия, которые являются простыми потенциями, присутствующими в зародышевых клетках, а действительные материальные различия, столь тонкие, что мы пока еще не в состоянии выявить их.

ВИРХОВ (1858)

Изучая период дробления, мы приближаемся к источнику, дающему начало прогрессивно разветвляющимся потокам дифференцировок, которые завершаются в конце концов почти тихими заводями — индивидуальными клетками взрослого организма.

ДЖАСТ (1939)

Введение

Каждый многоклеточный организм представляет собой сложный набор специализированных клеточных типов. Например, эритроциты и лейкоциты отличаются не только друг от друга, но и от клеток сердечной мышцы, которая обеспечивает циркуляцию форменных элементов крови по всему телу. Они отличаются также от имеющих отростки нейронов, проводящих нервные импульсы от мозга к сердцу, и от железистых клеток, выделяющих в кровь гормоны. В табл. 7.1 представлен далеко не полный список специализированных клеточных типов с указанием характерных продуктов их жизнедеятельности и основных функций.

Процесс развития специализированных клеточных типов из одного оплодотворенного яйца называется **дифференцировкой**. Этому явному изменению в биохимии и функции клеток предшествует процесс, называемый **детерминацией**, в течение которого определяется судьба клеток. Детерминация может осуществляться двумя разными способами. Первый заключается в **цитоплазматической сегрегации** детерминирующих молекул в период дробления, в результате чего качественно различные области цитоплазмы зиготы попадают в разные дочерние клетки. Второй способ детерминации — **эмбриональная ин-**

дукция — заключается во взаимодействии клеток или тканей, определяющем судьбу одного или обоих участников этого взаимодействия. Как будет показано ниже, в развитии любого организма в разной степени участвуют оба механизма. В этой главе основное внимание будет уделено опытам, свидетельствующим о существовании цитоплазматической сегрегации; следующая глава будет посвящена детерминации путем индукции (прогрессивной детерминации).

Преформация и эпигенез

Любая трактовка возникновения разных типов дифференцированных клеток из оплодотворенного яйца должна объяснить 1) постоянство морфологии каждого типа (т.е. почему из куриного яйца всегда вылупляется цыпленок, но не крокодил) и 2) разнообразие частей тела каждого организма. И в самом деле, одной из основных характеристик развития является то, что каждый вид воспроизводит свои специфические черты эмбриогенеза. Развитие включает в себя экспрессию наследственных свойств вида.

В XVII столетии понятия развитие и наследст-

Таблица 7.1. Некоторые типы дифференцированных клеток и их основные продукты

Тип клеток	Продукт дифференцированной клетки	Специализированная функция
Кератиноцит (клетка кожи)	Кератин	Защита от повреждения при трении и от высыхания
Эритроцит (красная кровяная клетка)	Гемоглобин	Транспорт кислорода
Клетка хрусталика	Кристаллины	Проведение света
В-лимфоцит	Иммуноглобулины	Синтез антител
Т-лимфоцит	Поверхностные антигены (лимфокины)	Разрушение чужеродных клеток; регуляция иммунного ответа
Меланоцит	Меланин	Образование пигмента
Клетки островков Лангерганса	Инсулин	Регуляция углеводного обмена
Клетка Лейдига (у самцов)	Тестостерон	Обеспечивает проявление мужских половых признаков
Хондроцит	Хондроитинсульфат; коллаген типа II	Образование хрящевого матрикса
Остеобласт	Костный матрикс	Образование костной ткани
Миоцит (мышечная клетка)	Актин и миозин	Мышцы
Гепатоцит (печеночная клетка)	Сывороточный альбумин; множество ферментов	Образование сывороточных белков и многочисленные ферментативные функции
Нейроны	Нейромедиаторы (ацетилхолин, адреналин и т. д.)	Передача электрических импульсов
Тубулярная клетка яйцевода курицы	Яичный альбумин	Синтез белков яйца для питания и защиты зародыша
Фолликулярная клетка яйцевода насекомых	Белки хориона	Белки яйцевой оболочки для защиты зародыша

венность были объединены в гипотезе, которая получила название **гипотеза преформации**. В соответствии с этой гипотезой считалось, что все органы взрослого организма в миниатюре представлены в спермии или (гораздо чаще) в яйце. Следовательно, организмы не «развиваются», а, скорее, «развертываются». Эта гипотеза основывалась как на научных данных, так и на философских концепциях (Gould, 1977; Roe, 1981). Во-первых, считалось, что, поскольку все органы преобразованы, зародышевое развитие – это всего лишь рост существующих структур, а не формирование новых. Из этого вытекало, что эмбриональное развитие не нуждалось в действии какой-либо внешней таинственной силы. Во-вторых, точно так же, как взрослый организм был преформирован в первичных половых клетках, другое поколение было преформировано внутри первичных половых клеток первого преформированного поколения. Эта гипотеза, названная **теорией вложения** (инкапсуляции), давала уверенность в том, что вид всегда будет оставаться постоянным. Неко-

торые микроскописты утверждали, что видят полностью сформированных миниатюрных человечков в спермии или в яйце, однако главные защитники этой гипотезы Альбрехт фон Галлер (Haller) и Шарль Боннез (Bonnet) знали, что системы органов развиваются с разной скоростью и что эмбриональные структуры не обязательно находятся в том же месте, в каком эти структуры находятся у новорожденного.

В распоряжении преформистов еще не было клеточной теории, чтобы они могли предусмотреть нижний предел размеров их преформированных организмов, и они не смотрели на пребывание человечества на Земле как на нечто потенциально бесконечное. Боннез (Bonnet, 1764) говорил: «Природа может создать любую малость», а человеческий род существует лишь ограниченное время, которое отпущено ему между Сотворением мира и днем Страшного суда. Это утверждение не противоречило науке того времени, подтверждая принцип французского математика и философа Рене

Декарта о бесконечной делимости механической природы, — делимости, начатой Богом, в которую он далее не вмешивался.

Теория преформации была консервативна, поскольку из нее вытекало, что каких-либо изменений в последовательных поколениях происходить не может. Принципиальный недостаток этой теории заключался в том, что с ее помощью невозможно было объяснить изменчивость, которая к тому времени была известна из очень небольшого числа генетических данных. Было известно, например, что от белого и черного родителей могут рождаться дети с промежуточным цветом кожи, что невозможно, если наследственность и развитие обуславливаются природой либо спермией, либо яйцом. В более строго контролируемых опытах немецкий ботаник Кёльрейтер (Kölreuter, 1766) получил гибриды табака, имеющие признаки обоих видов. Более того, скрещивая гибрид либо с мужским, либо с женским родителем, он смог после нескольких поколений «возвратить» гибрид обратно к одному или к другому родительскому типу. Таким образом, стало ясно, что признаки потомства представляют собой некую смесь родительских признаков. Помимо этого, теория преформизма не могла объяснить случаи рождения уродов и детей с явными отклонениями (например, с шестью пальцами на конечностях) у нормальных родителей.

Нужна была другая гипотеза, и она была предложена — это гипотеза эпигенеза. В соответствии с ней постулировалось, что каждый взрослый организм развивается заново из недифференцированного состояния. Этот взгляд на развитие, имевший философские корни, идущие еще от воззрений Аристотеля, был возрожден немецким эмбриологом, работавшим в Санкт-Петербурге, Каспаром Фридрихом Вольфом (K. F. Wolff). Тщательно наблюдая за развитием куриного зародыша, Вольф показал, что части зародыша развиваются из тканей, не имеющих аналогов во взрослом организме. Так, например, можно было проследить, что сердце и кровеносные сосуды (которые, согласно гипотезе преформизма, должны присутствовать с самого начала, чтобы обеспечивать рост зародыша) у каждого зародыша развиваются заново. Сходным образом можно было видеть, что пищеварительная трубка возникает в результате сворачивания первоначально плоской ткани. Это последнее наблюдение было детально описано Вольфом, заявившим (1767): «Если тщательно взвесить все данные об образовании кишечника таким способом, то, я полагаю, практически не остается сомнений в правильности теории эпигенеза». Однако чтобы объяснить создание организма заново в каждом поколении, Вольф был вынужден постулировать некую неизвестную силу, vis essentialis («жизненную энергию»), которая,

действуя подобно силе тяжести или магнетизму, должна была организовывать эмбриональное развитие.

Следовательно, если с позиций преформизма можно было легче объяснить непрерывность поколений, то с позиций эпигенеза легче объяснить изменчивость и результаты прямых наблюдений над формированием органов. Немецкий философ Иммануил Кант (1724–1804) и его коллега биолог Иоганн Фридрих Блументбах (1752–1840) попытались примирить эти противоположные гипотезы. Стремясь построить научную теорию происхождения рас, Блументбах постулировал существование механической целенаправленной силы, названной им *Bildungstrieb* («формообразующее стремление»). Существование этой силы, утверждал он, может быть доказано не только теоретически, но и экспериментально. Например, гидра, будучи разрезанной, регенерирует ампутированные части посредством перераспределения существующих элементов. Следовательно, в данном случае наблюдается действие некоей целесообразной организующей силы и эта сила заключена в самом организме. Блументбах полагал, что *Bildungstrieb* наследуется через половые клетки. Таким образом, развитие могло происходить эпигенетически благодаря преддетерминированной силе, наследуемой с веществом зародыша (Cassirer, 1950; Lenoir, 1980). Кроме того, эта сила могла изменяться, и в качестве примера такого изменения приводили вариант левозакрученной спирали раковины улитки. От этой гипотезы, согласно которой преформированные инструкции направляют эпигенетическое развитие, не так далеко до взглядов некоторых современных биологов, считающих, что «полное описание организма уже записано в яйце» (Brenner, 1979). Однако вплоть до начала двадцатого столетия, когда вновь были открыты работы Менделя, последовательной генетической теории, в которой нашли бы место такие идеи о наследственной изменчивости, не существовало, и каждый ученый мог свободно строить свои предположения о механизмах наследования признаков в развитии.

Французские тератологи

Попытки найти гипотезу, объясняющую одновременно постоянство вида и эпигенетический характер развития, привели к созданию современной эмбриологии. Поиски такой гипотезы были предприняты в двух различных направлениях. Одно из этих направлений, разрабатываемое во Франции, основывалось на анатомических аспектах тератогенеза. Ученые пытались выявить ошибки в эмбриогенезе, которые приводили к рождению детей с аномалиями развития. Другое направление поисков

такой гипотезы было сосредоточено в Германии, и здесь внимание было сфокусировано на физиологии развития. Обе исследовательские группы начали экспериментировать на зародышах с целью изучить реакции развивающегося организма на различные вмешательства (Churchill, 1973; Fischer, Smith, 1984).

Тератологические опыты французов начались в 20-х годах прошлого века с исследований Этьена Жоффруа Сент-Илера и его сына Исидора. Эти исследователи пытались доказать, что врожденные аномалии являются результатом нарушенного развития плода, а не преформированных отклонений. Поэтому они надеялись искусственно вызвать аномалии развития, изменяя условия инкубации куриных яиц. В большинстве случаев эти попытки были безуспешными (из-за грубой методики зародыши либо продолжали развиваться нормально, либо погибали), но они подготовили почву для проведения более тонкого анализа в работах Дареста (Dareste, 1877). Дарест проделал тысячи опытов и проследил возникшие у кур аномалии, начиная с ранних стадий развития.

Однако куриный зародыш оказался плохим объектом для изучения самых ранних стадий эмбриогенеза. Чтобы выяснить, будут ли нарушения на ранних стадиях развития влиять на структуры взрослого организма, следовало использовать другое животное. В 1886 г. Лоран Шабри (Chabry, 1887) начал изучать тератогенез на более доступном зародыше оболочников. Это был удачный выбор, потому что зародыши оболочников быстро превращаются в личинку с относительно небольшим числом клеточных типов. Шабри собирался вызывать специфические нарушения, отделя скальпелем определенные бластомеры дробящегося зародыша оболочников. Он обнаружил, что каждый бластомер ответствен за образование специфического набора тканей личинки. Если удалить какие-либо бластомеры, то у личинки будут отсутствовать как раз те структуры, которые в норме из них формируются. Кроме того, он обнаружил, что если изолировать определенные группы клеток зародыша, то из них формируются характерные структуры без связи с другими клетками. Следовательно, каждая из клеток у оболочников развивается, по-видимому, автономно. Такой способ развития часто называют **мозаичным**, потому что зародыш представляет собой как бы мозаику самодифференцирующихся частей.

Цитоплазматическая спецификация у зародышей оболочников

Более поздние исследования показали, что зародыш оболочников почти точно соответствует предположению о нем как о «мозаике самодифференциру-

ющихся частей», конструируемой на основе информации, которая была накоплена в цитоплазме ооцита. По мере того как зародыш делится, в различные клетки включаются разные участки цитоплазмы. Полагают, что эти разные цитоплазматические участки содержат морфогенетические детерминанты, контролирующие детерминацию (коммитирование) данной клетки к образованию клеток определенного типа. Изучение детерминации клеток у оболочников в значительной степени облегчалось тем обстоятельством, что у некоторых видов цитоплазма яйца сразу после его оплодотворения сегрегируется на ряд по-разному окрашенных областей. (Это можно видеть на цветной таблице на внутренней стороне обложки книги.) Конклин (Conklin, 1905) описал, как эти окрашенные области распределяются по разным бластомерам. Первое деление дробления разделяет яйцо на правую и левую половины, являющиеся зеркальным отражением одна другой. Каждое последующее клеточное деление на правой и левой стороне происходит синхронно. Проследив судьбу *каждого* бластомера асидии *Styela partita*, Конклин пришел к поразительному заключению, что каждая окрашенная область имеет свою особую судьбу (рис. 7.1). Желтый серп цитоплазмы дает начало мышечным клеткам; из серого экваториального серпа образуются хорда и нервная трубка; прозрачная анимальная цитоплазма становится эпидермисом личинки; из содержащей желток серой вегетативной области яйца возникает кишка личинки.

Ревербери и Минганти (Reverberi, Minganti, 1946) изучали детерминацию у оболочников в серии экспериментов по изоляции бластомеров; эти авторы также наблюдали самодифференцировку каждого изолированного бластомера и остальной части зародыша. Результаты одного из опытов показаны на рис. 7.2. Если 8-клеточный зародыш разделить на четыре части по два бластомера в каждой (правая и левая стороны эквивалентны), то мозаичная детерминация их является правилом. Задняя анимальная пара бластомеров дает начало эктодерме, задняя вегетативная пара продуцирует энтодерму, мезенхиму и мышечную ткань, как это и следовало ожидать, исходя из карты презумптивных зачатков. Однако развитие нейральных структур является исключением. Клетки, образующие нервную систему, происходят из двух передних квадрантов — анимального и вегетативного, но ни один из них по отдельности не дает начало нервным клеткам. Если эти передние пары вновь соединяют вместе, то возникают ткани мозга и пальпы (прикрепительные сосочки). Другими словами, даже в таком строго детерминированном зародыше, как зародыш оболочников, осуществляются некоторые индукционные взаимодействия между бластомерами. И действительно, Ортолани (Ortolani, 1959) показал, что эта

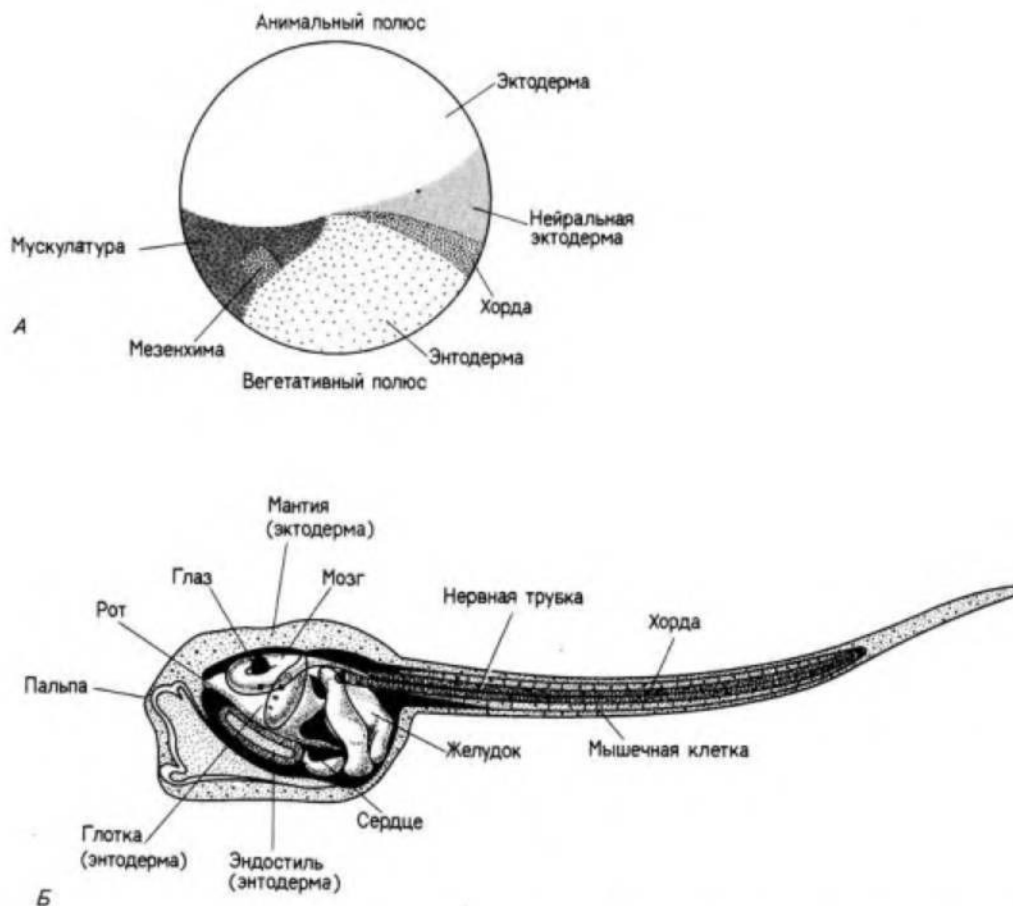


Рис. 7.1. Сегрегация цитоплазматических детерминантов в период оплодотворения. А. Различающиеся по окраске цитоплазматические области оплодотворенного яйца асидии (*Styela partita*) и их перспективное значение. Б. Строение личинки оболочников.

область эктодермы не детерминирована к состоянию «нейральности» вплоть до стадии 64 клеток, непосредственно предшествующей началу гаструляции. Таким образом, хотя большая часть тканей у этих зародышей детерминируется сразу же после оплодотворения, некоторые ткани претерпевают прогрессивную детерминацию.

В 1973 г. Уиттейкер (Whittaker, 1973) получил убедительные биохимические данные, свидетельствующие о цитоплазматической сегрегации тканевых детерминантов у оболочников. Он окрашивал клетки на присутствие или отсутствие в них фермента ацетилхолинэстеразы. Этот фермент содержится только в мышечной ткани личинки и участвует в возникновении способности мышц реагировать на повторные нервные импульсы. Результаты исследований Конклина и других авторов, касающиеся судьбы потомства каждого из бластомеров, или клеточных линий (рис. 7.2 и 7.3), показали, что

только одна пара бластомеров (задняя вегетативная, B4.1) у 8-клеточного зародыша способна дать начало мышечной ткани. Когда Уиттейкер удалял эти две клетки и культивировал их по отдельности, они образовывали мышечную ткань, которая положительно окрашивалась на ацетилхолинэстеразу. Из остальных 6/8 зародыша возникала личинка, лишенная мышц и не обнаруживавшая сколько-нибудь явной холинэстеразной активности (рис. 7.4)¹.

Помимо этого Уиттейкер останавливал развитие зародышей оболочников на разных стадиях, обра-

¹ Было показано (Deno et al., 1984; Nishida, 1987), что по меньшей мере у некоторых видов оболочников пары бластомеров b4.2 и A4.1 также дают начало мышечным клеткам. Однако это можно увидеть только на целых зародышах, а не на изолированных бластомерах. Эти мышечные клетки, происходящие не из пары бластомеров B4.1, по-видимому, образуются в результате индукции (Whittaker, 1987; Meedel et al., 1987).

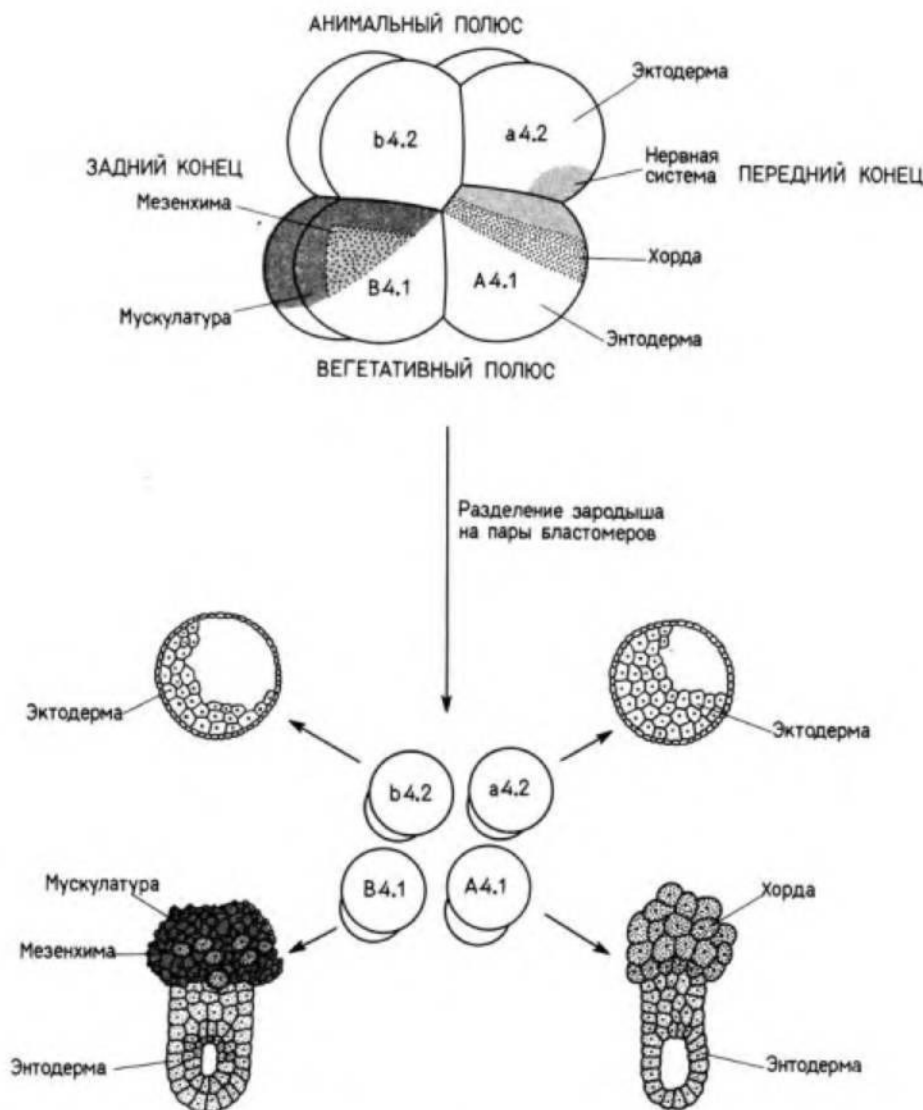


Рис. 7.2. Мозаичная детерминация у оболочников. Если 8-клеточный зародыш оболочника разделить на 4 пары бластомеров, то из каждой пары формируются определенные структуры. (По Reverberi, Minganti, 1946.)

батывая зародышей цитохалазином В. Это вещество связывается с микрофиламентами, предотвращая тем самым цитокinesis (деление цитоплазмы клеток), и не влияет на нормальное деление ядер. В результате все дальнейшее развитие происходит в пределах популяции тех клеток, которые имелись к моменту добавления цитохалазина. После того как у зародышей было полностью заблокировано дробление, им давали возможность развиваться какое-то время и затем окрашивали на присутствие ацетилхолинэстеразы. Результаты оказались поразительными. Их сравнение (рис. 7.5) с картой клеточных линий (рис. 7.3) показало полное совпадение данных. Способностью к образованию мышечных клеток первоначально обладали оба бластомера. Однако к 4-клеточной стадии способность синтезировать

ацетилхолинэстеразу сохранялась только у вегетативных бластомеров. У 8-клеточного зародыша такие клетки формировались только из двух задних вегетативных бластомеров. Как известно, именно эти клетки формируют большую часть мышц хвоста у личинки оболочника (Meedel et al., 1987; Nishida, 1987).

Клетки, потомки которых, как было показано, синтезировали ацетилхолинэстеразу, оказались клетками, предназначенными образовывать мышцы. Кроме того, синтез фермента в изолированных клетках происходил точно в то же время, в которое он появился в нормальных зародышах (Satoh, 1979). Когда в 8-клеточном зародыше асцидии цитоплазму из бластомера В4.1 (дающего начало мышцам) переносили в формирующий эктодерму бластомер



Рис. 7.3. Последовательность клеточных линий и их судьба в эмбриональном развитии оболочников. Поскольку правая и левая половины развиваются идентично, на рисунке представлена только одна половина. (По Whittaker, 1979; Meedel et al., 1987; Nishida, 1987.)

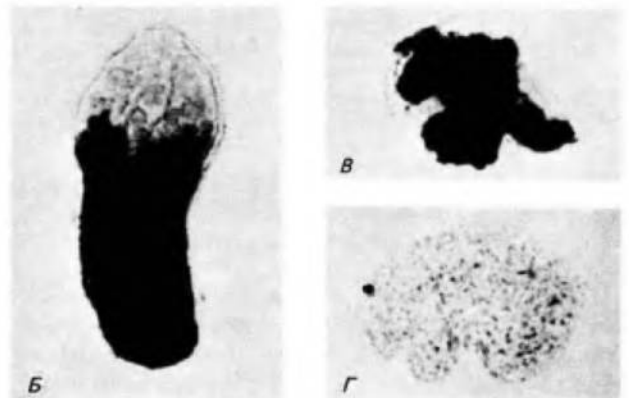


Рис. 7.4. Способность к синтезу ацетилхолинэстеразы в потомстве blastомеров мышечной линии (B4.1), изолированных на 8-клеточной стадии. А. Схема процедуры изоляции. Б. Локализация ацетилхолинэстеразы в хвостовой мускулатуре интактной личинки оболочника. Фермент обнаружен в потомстве пары blastомеров B4.1 (Б), но не в потомстве остальных $6/8$ зародыша (Г), инкубировавшихся в течение времени, необходимого для достижения стадии личинки. (Из Whittaker et al., 1977; фотографии с любезного разрешения J. R. Whittaker.)

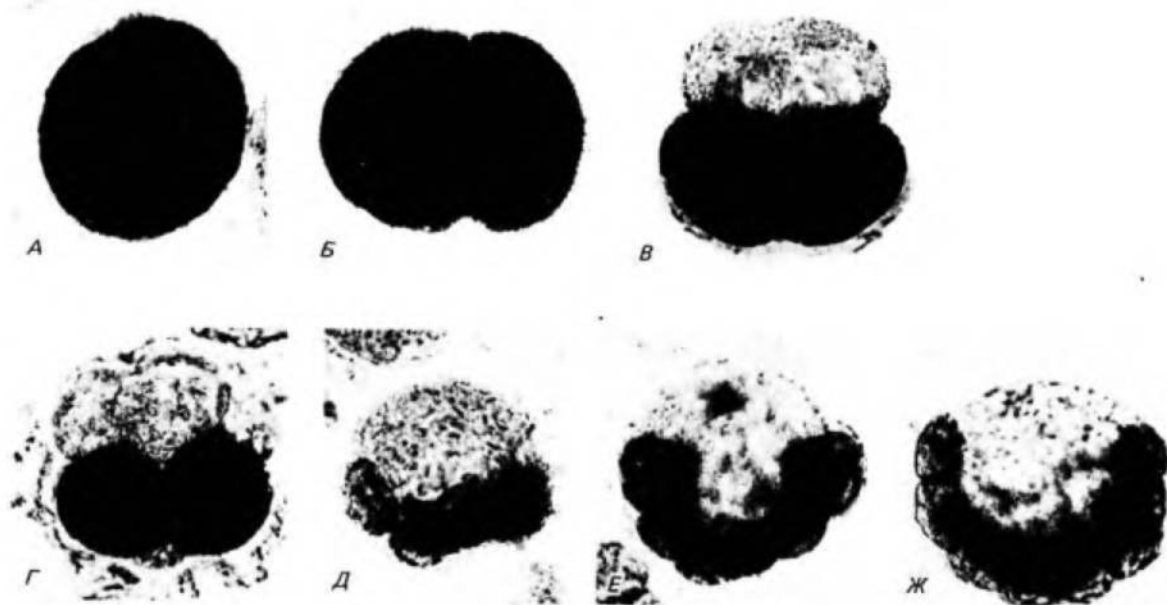


Рис. 7.5. Локализация ацетилхолинэстеразы в зародышах оболочников, развитие которых было остановлено на разных стадиях обработкой цитохалазином В. А. 1-клеточная стадия. Б. 2-клеточная стадия. В. 4-клеточная стадия. Г. 8-клеточная стадия. Д. 16-клеточная стадия. Е. 32-клеточная стадия. Ж. 64-клеточная стадия. (Из Whittaker, 1973а; фотографии с любезного разрешения J. R. Whittaker.)

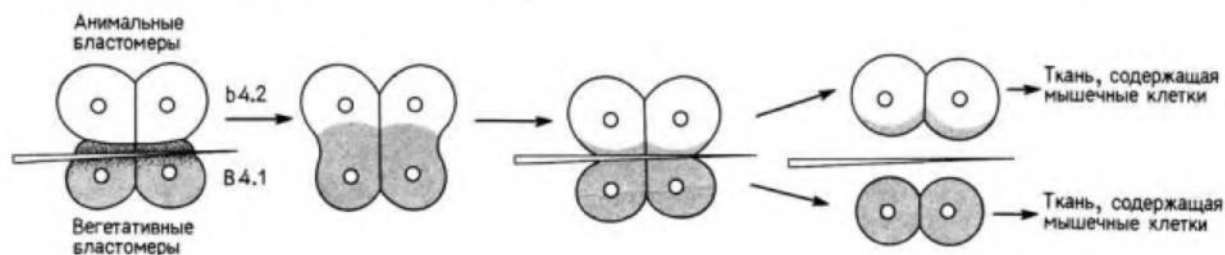


Рис. 7.6. Микрохирургическая процедура, позволяющая некоторому количеству цитоплазмы из области желтого серпа переместиться в анимальные клетки. В опыте использованы яйца оболочников. Надавливание на бластомеры В4.1 стеклянной иглой вызывает регрессию борозды дробления. Борозда может образоваться вновь несколько ближе к вегетативному полюсу, там, где клетки были отрезаны иглой. Эта борозда отделяет пару бластомеров таким образом, что бластомеры анимального полюса (В4.2) получают цитоплазму желтого серпа. Цитоплазма вегетативного полюса на рисунке обозначена серым цветом. (По Whittaker, 1982.)

В4.2, из него помимо нормальных эктодермальных клеток возникали еще и мышечные (рис. 7.6; Whittaker, 1982). Напротив, Тунг и др. (Tung et al., 1977) показали, что если ядра личинки трансплантировать в энуклеированные фрагменты яиц, то вновь образующиеся клетки имеют структуры, типичные для клеток-доноров цитоплазмы, а не для клеток, являющихся донорами ядер. Отсюда мы можем заключить, что определенные детерминанты, содержащиеся в цитоплазме, вызывают образование определенных тканей. Эти морфогенетические детерминанты (или морфогены), по-видимому, дейст-

вуют посредством избирательной активации (или инактивации) специфических генов. Следовательно, детерминация бластомеров и активация определенных генов контролируются пространственной локализацией морфогенетических детерминантов в цитоплазме яйца.

Природа морфогенетических детерминантов у оболочников

Данные о природе цитоплазматических детерминантов противоречивы. Результаты исследований с применением ингибиторов транскрипции и транс-

лянии свидетельствуют о том, что у зародыша оболочников имеются цитоплазматические факторы двух типов. Факторы первого типа ответственны за активацию транскрипции определенных генов в тех клетках, которые содержат эти факторы. По-видимому, факторы этого типа активируют ген ацетилхолинэстеразы. Когда зародыши оболочников растут в присутствии ингибитора транскрипции актиномицина D, ацетилхолинэстеразная активность у них отсутствует. Следовательно, можно предположить, что гены, ответственные за синтез ацетилхолинэстеразы, в данном случае не активируются. Кроме того, если РНК, выделенную из зародышей *Ciona* на разных стадиях развития, инъецировать в ооциты лягушки, то в этих ооцитах будут транслироваться введенные в них новые мРНК. С помощью этой методики Мидель и Уиттейкер (Meedel, Whittaker, 1983, 1984) обнаружили, что мРНК для ацетилхолинэстеразы не выявляется до стадии гаструлы, когда она обнаруживается только в потомках бластомеров В4.1. Следовательно, для образования этого фермента необходим синтез новой РНК. Было показано (Crowther, Whittaker, 1984), что очень многие специфические клеточные маркеры, по которым можно судить о развитии асцидий, чувствительны к ингибиторам транскрипции, и поэтому морфогенетические детерминанты вообще могут действовать как активаторы специфической транскрипции.

Опыты с ингибиторами также показали, что некоторые детерминанты, как и мРНК, могут накапливаться в определенных областях яйца. С такой ситуацией мы, по-видимому, встречаемся в случае синтеза щелочной фосфатазы в кишечнике зародышей оболочников. Этот фермент синтезируется в энтодерме личинки и сегрегируется в тех клетках, которые формируют кишку (рис. 7.7). Актиномицин D не оказывает влияния на синтез этого фермента, хотя ингибиторы трансляции предотвращают его экспрессию (Whittaker, 1977). Следовательно, мРНК для кишечной щелочной фосфатазы уже должна содержаться в цитоплазме ооцита. Каким-то образом мРНК сама должна попасть в соответствующий бластомер. Результаты недавних исследований позволяют предположить, что этот процесс осуществляется не без помощи цитоскелета (см. ниже разд. «Дополнительные сведения и гипотезы»).

Джеффри и др. (Jeffery et al., 1986) показали, что помимо мРНК в яйце накапливается специфический для мышц актин. Эти авторы обнаружили, однако, что в энуклеированных оплодотворенных яйцах *Styela* щелочная фосфатаза не синтезируется. Если бы синтез щелочной фосфатазы был полностью независим от ядра, то ее можно было бы обнаружить. Такое несоответствие ставит перед нами несколько важных вопросов о том, какие выводы



Рис. 7.7. Локализация щелочной фосфатазы у зародышей *Ciona*, развитие которых было остановлено на разных стадиях цитохалазином В. А. 2-клеточная стадия. Б. 4-клеточная стадия. В. 8-клеточная стадия. Г. 16-клеточная стадия. Реакции на фермент, проводимые через 14–16 ч после оплодотворения, выявили локализацию детерминантов щелочной фосфатазы. (Из Whittaker, 1977; фотографии с любезного разрешения J. R. Whittaker.)

и из каких данных могут быть сделаны. В лаборатории Уиттейкера измеряли уровень ферментативной активности у зародышей, развивавшихся в среде, в которой содержались ингибиторы. Результаты позволяют предположить, что ингибиторы проникают в каждую клетку одинаковым путем, одинаково действуют на каждый ген и не оказывают никакого другого заметного влияния на развитие (кроме специфического подавления транскрипции или трансляции). В лаборатории Джеффри измеряли активность щелочной фосфатазы в энуклеированных яйцах, принимая, что мРНК для этого фермента (если она существует) не локализована в том компартменте клетки, который остается связанным с женским пронуклеусом. Предполагалось также, что трансляция этой мРНК не зависит от других факторов, которые могут контролироваться на уровне транскрипции. Ни одна из упомянутых выше двух групп исследователей не могла получить прямых данных о событиях, приводящих к детерминации клеток. Они пользовались данными о процессах клеточной дифференцировки для количественного анализа раннего состояния детерминации. А между тем анализ детерминации должен привести к идентификации специфических белков или мРНК, которые определяют (коммитируют) судьбу клетки (а не тех специфических белков или мРНК, которые синтезируются в результате этого коммитирования).

Выделить внутриклеточные морфогены стандартными биохимическими методами оказалось чрезвычайно трудным делом. Вероятно, морфогены лабильны и содержатся в зародышах в низких концентрациях, а специалисты в области биологии развития располагают для работы лишь ограниченным числом зародышей (в отличие от микробиологов, которые могут начинать опыты, имея килограммы *E. coli*). Недавно появились два альтернативных подхода к биохимическому выделению морфогенов. Один из них – генетический подход, состоящий в том, чтобы идентифицировать мутантные гены, ответственные за синтез нефункциональных морфо-

генов. Затем следует клонировать нормальные аллели (аллели дикого типа) для этих морфогенов. Генетический подход может быть использован только на таких организмах, как дрозофила, геном которой хорошо изучен, а мутанты могут быть легко выявлены. Работа в этом направлении началась, и мы обсудим полученные результаты в настоящей главе позже.

Второй альтернативный подход – иммунологический, предполагающий получение антител, которые специфически связываются с цитоплазматическими молекулами. Этот метод был использован Нисикатой и др. (Nishikata et al., 1987), которые из области желтого серпа пытались выделить в чистом виде детерминанты, определяющие формирование мышц. Эти авторы производили инъекцию цитоплазмы желтого серпа яиц оболочников мыши, у которой в результате инъекции начинали вырабатываться антитела к чужеродному материалу. Некоторые полученные антитела специфически связывались с областью желтого серпа в яйце и были способны подавить образование специфической для мышц ацетилхолинэстеразы. В настоящее время исследования продолжают с целью идентифицировать молекулы, связывающиеся с этими антителами, и охарактеризовать их активность во время развития.

Цитоплазматическая локализация у зародышей моллюсков

«Мозаичный» тип дифференцировки широко распространен в животном царстве, особенно у таких организмов, как гребневики, кольчатые и круглые черви и моллюски, – т.е. у животных, у которых гастрюляция начинается на будущем переднем конце зародыша после небольшого числа делений. Моллюски дают один из наиболее впечатляющих примеров мозаичного развития и феномена **цитоплазматической локализации**, когда морфогенетические детерминанты обнаруживаются в специфической области ооцита.

Дополнительные сведения и гипотезы

Внутриклеточная локализация и движения морфогенетических детерминантов

Различные компоненты оплодотворенного яйца (в том числе желток, пигмент и растворимые белки) можно легко сместить центрифугированием, однако такое смещение обычно не влияет на эмбриогенез (см. обзор Morgan, 1927). Из этого следует, что либо

молекулы детерминантов слишком малы, чтобы двигаться под действием центрифугирования, либо они каким-то образом закреплены в яйце («заякорены»). Отсутствие диффузии, о которой свидетельствует цитоплазматическая локализация этих детер-

минантов, опровергает первую возможность. Более вероятно, что детерминанты прикреплены к нерастворимому материалу, возможно к цитоскелету клетки. Эта инфраструктура, состоящая из филаментов и трубочек, распространена по всей клетке, но особенно хорошо выражена в кортикальном слое цитоплазмы ооцита. Было показано (Cervera et al., 1981), что в культивируемых клетках большая часть РНК ассоциирована с цитоскелетом. Следовательно, цитоскелет может являться местом специфической локализации цитоплазматических детерминантов.

Цитоскелет можно выделить из клеток с помощью неионных детергентов, таких, как тритон X-100. Детергент растворяет липиды, тРНК и монорибосомы. Остающийся цитоскелет содержит микротрубочки, микрофиламенты, промежуточные филаменты и примерно 200 белков, в том числе белок, способный связываться с 5'-концом мРНК (Zumbe et al., 1982; Moon et al., 1983). У оболочников *Styela* и *Boltenia* желтый серп, из материала которого формируются мышцы, характеризуется актин-содержащим цитоскелетным доменом. Этот домен первоначально распределен в неоплодотворенном яйце равномерно. После оплодотворения, однако, актиновые микрофиламенты сокращаются и сегрегируются в blastomeres, предназначенных для формирования мышц, при этом они захватывают с собой желтые пигментные гранулы и ряд мРНК (Jeffery, Meier, 1983; Jeffery, 1984). На рис. 7.8 можно видеть, что цитоскелет содержит желтые пигментные гранулы, которые получили свою внутриклеточную локализацию в результате движений цитоплазмы ооцита в период оплодотворения. Белки этой области желтого серпа значительно отличаются от белков остальной части яйца, тогда как мРНК этой области, по-видимому, не являются специфичными для желтого серпа (Jeffery, 1985). Таким образом, цитоскелет может служить якорем для морфогенетических факторов, детерминирующих судьбу клетки зародыша.

Локализация специфических белков или мРНК в специфических областях яйца не ограничена «мозаичными» зародышами. Было показано (Weeks et al., 1985), что анимальные и вегетативные шапочки яиц амфибий также содержат некоторые уникальные мРНК. Эти исследования начались с выделения мРНК из растущих ооцитов (рис. 7.9). Используя методику, которая будет подробно изложена в гл. 10, исследователи выделили и очистили мРНК из различных областей яйца лягушки. Большая часть мРНК из анимальной и вегетативной шапочек яйца оказались идентичными, однако небольшой процент РНК из анимальной области не был представлен в вегетативной цитоплазме, а некоторые мРНК вегетативной шапочки не были обнаружены в анимальной цитоплазме. Одна из таких уникаль-

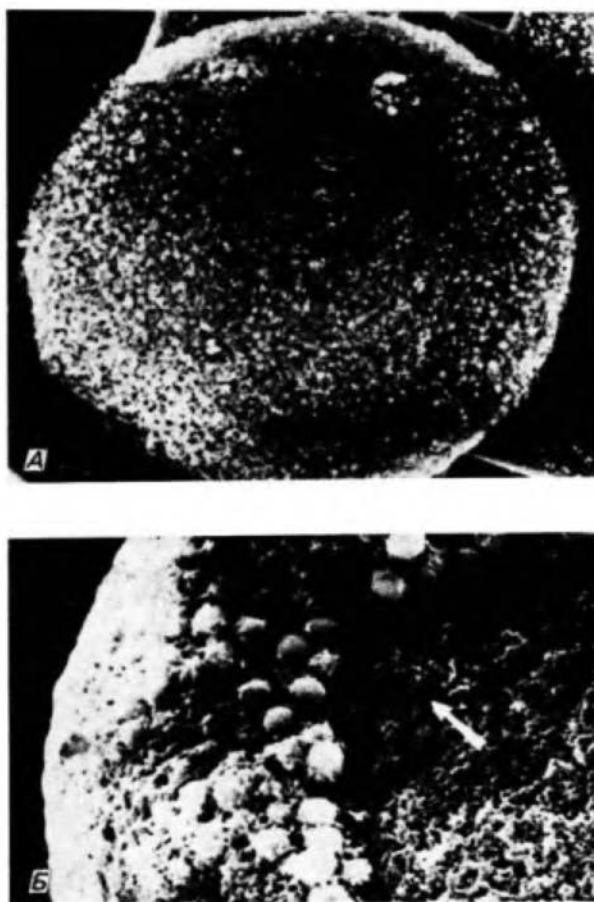
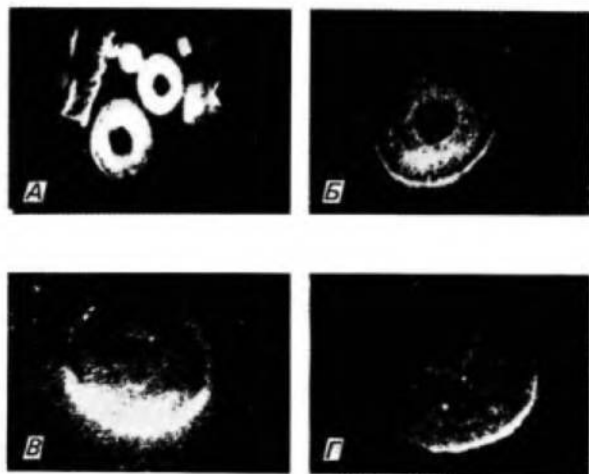


Рис. 7.8. Сегрегация морфогенетических детерминантов в яйцах оболочников. Яйца обрабатывали тритоном X-100 — детергентом, растворяющим мембрану, что позволяло наблюдать цитоскелетные компоненты. А. Неоплодотворенное яйцо *Styela*; желтые пигментные гранулы и цитоскелет видны по всей поверхности. Б. Сегрегация желтой цитоплазмы в только что оплодотворенной зиготе *Boltenia*. Область, содержащая желтые пигментные гранулы, приподнята и состоит из собственно плазматической мембраны и лежащего глубже сплетения филаментов. Предполагаемое направление миграции пигмента показано стрелкой. Фотографии получены с помощью сканирующего электронного микроскопа. (Из Jeffery, Meier, 1983; фотографии с любезного разрешения S. Meier.)

ных вегетативных мРНК была обнаружена в опытах, в которых развивающиеся яйца лягушки инкубировали с радиоактивной ДНК, комплементарной этой мРНК из вегетативной области. (Эта кДНК была получена путем транскрибирования РНК на другой нити ДНК этого гена). Если комплементарная ДНК находила эту мРНК, то она связывалась с ней и оставалась в клетке. Присутствие радиоактивности выявляли с помощью фотографической эмульсии, на которой после экспозиции и проявления оставался след. Рис. 7.9 показывает, что в ран-



них ооцитах эта мРНК из вегетативной области (называемая Bg1) обнаруживается во всем ооците. Правда, по мере развития ооцита она становится локализованной в вегетативной области яйца (Melton, 1987). Механизм перемещения Bg1 в вегетативную область пока неизвестен.

Рис. 7.9. Локализация мРНК в вегетативной шапочке ооцита *Xenopus*. Ооциты на разных стадиях развития инкубировали с радиоактивной РНК, комплементарной Bg1 мРНК. Присутствие и локализацию Bg1 можно было обнаружить по наличию радиоактивности в любой области яйца (поскольку радиоактивное излучение выявляется с помощью фотографической эмульсии). В ранних ооцитах (А) Bg1 мРНК распределена равномерно по всей цитоплазме. Однако по мере созревания ооцита (Б–Г) Bg1 мРНК постепенно локализуется в области вегетативного полюса яйца. Темная область вблизи центра ооцитов – зародышевый пузырек. (Из Melton, 1987; фотографии с любезного разрешения D. Melton.)

В начале века выдающийся американский эмбриолог Вильсон опубликовал результаты интереснейших опытов. Он изолировал ранние бластомеры зародышей моллюска *Patella coerulea* и сравнивал их развитие с развитием таких же клеток, оставленных в других зародышах. На рис. 7.10 приведены некоторые результаты опытов, опубликованные Вильсоном в 1904 г. Изолированные бластомеры не только дифференцировались соответственно их проспективному значению (в этом случае формировались реснитчатые клетки трохобласта), но и осуществляли то же самое число клеточных

делений и точно в то же самое время, как это делали такие же клетки, оставшиеся в интактном контрольном зародыше. Ориентация этих делений дробления была правильной, и в соответствующее время образовавшиеся клетки формировали реснички. На основании результатов своих опытов Вильсон пришел к выводу, что сами клетки содержат факторы, детерминирующие форму и ритм делений дробления, а сложная дифференцировка, которую они претерпевают, не зависит полностью от их связей с остальной частью зародыша.

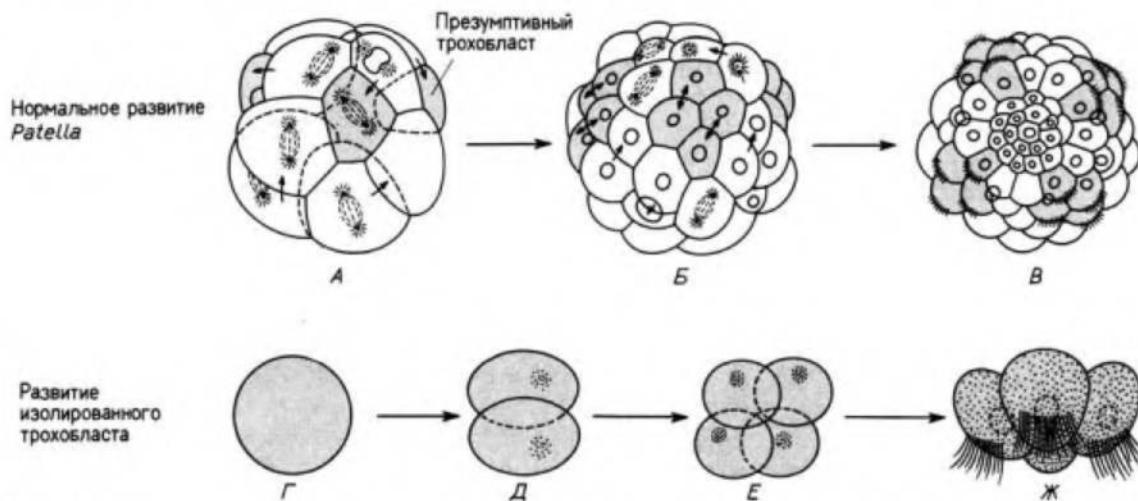


Рис. 7.10. Дифференцировка клеток трохобласта у нормального зародыша моллюска *Patella* (А–В) и изолированных клеток трохобласта, культивируемых *in vitro* (Г–Ж). А. Стадия 16 клеток, вид сбоку; презумптивные клетки трохобласта выделены серым цветом. Б. Стадия 48 клеток. В. Личинка, несущая реснички (вид с анимального полюса). Реснички видны в клетках трохобласта. Г. Изолированная клетка трохобласта. Д, Е. Результаты первого и второго делений в культуре клеток. Ж. Образование ресничек на поверхности изолированных клеток, показанных на рис. 7.10, Е; даже в культуре изолированных клеток появление ресничек по времени точно соответствует их появлению у контрольных зародышей. (По Wilson, 1904.)

Полярная лопасть

В своем следующем опыте Вильсон сумел показать, что такое развитие предопределено сегрегацией (распределением) специфических морфогенетических детерминантов по специфическим blastomeres. У зародышей некоторых животных со спиральным дроблением (главным образом у моллюсков и кольчатых червей) непосредственно перед первым делением дробления образуется вырост цитоплазмы (рис. 7.11). Этот вырост называют **полярной лопастью**. У некоторых видов улиток участок, соединяющий полярную лопасть с яйцом, представляет собой тонкую перемычку. Первое деление дробления делит зиготу асимметрично таким образом, что полярная лопасть соединяется только с blastomere CD. У некоторых видов почти одна треть всего объема цитоплазмы сосредоточена в этой безъядерной лопасти, что придает ей вид отдельной клетки. Стадию двух blastomeres, на которой зародыш имеет такую трехдольную структуру, часто называют **трилистником** (рис. 7.12). Затем полярная лопасть втягивается в blastomere CD, но снова образуется перед вторым делением (рис. 7.11). После этого деления полярная лопасть оказывается прикрепленной только к blastomere D, в который она и втягивается. В дальнейшем полярная лопасть более не образуется.

Вильсон показал, что если удалить полярную лопасть на стадии трилистника, оставшиеся клетки делятся нормально. Однако вместо образования нормальной трохофоры (личинки улитки) развивается неполная личинка, совершенно лишенная мезодермальных органов — мышц, рта, раковинной же-

лезы¹ и ноги. Кроме того, Вильсон обнаружил, что тот же самый тип аномального зародыша может быть получен в результате удаления blastomere D на 4-клеточной стадии. На основе этого он пришел к выводу, что цитоплазма полярной лопасти содержит детерминанты мезодермы, которые и придают blastomere D его способность формировать мезодерму. Вильсон также показал, что локализация мезодермальных детерминантов устанавливается вскоре после оплодотворения и что специфическая цитоплазматическая область яйца, предназначенная быть включенной в blastomere D, содержит какие-то «факторы», необходимые для установления особого ритма дробления blastomere D и для дифференцировки мезодермы.

Морфогенетические детерминанты, содержащиеся в полярной лопасти, по-видимому, локализованы в цитоскелете или в кортикальном слое, а не в жидкой части цитоплазмы зародыша. Клемент (Clement, 1968) центрифугировал зародышей улитки *Lymnaea obsoleta* на стадии трилистника, вызывая перетекание жидкой части цитоплазмы обратно в blastomere CD. Однако, когда он затем отрезал полярную лопасть, у сформировавшегося зародыша *опять отсутствовали* производные мезодермы. Ван ден Битгелаар получил сходные результаты, удаляя цитоплазму из полярной лопасти микропипеткой. Жидкая цитоплазма из других областей клетки

¹ Раковинная железа — эктодермальный орган, формирующийся благодаря индукционному влиянию мезодермальных клеток. Без мезодермы в зародыше нет клеток, способных индуцировать компетентную эктодерму. Таким образом, мы снова встречаемся с ограниченной индукцией у мозаичного зародыша.

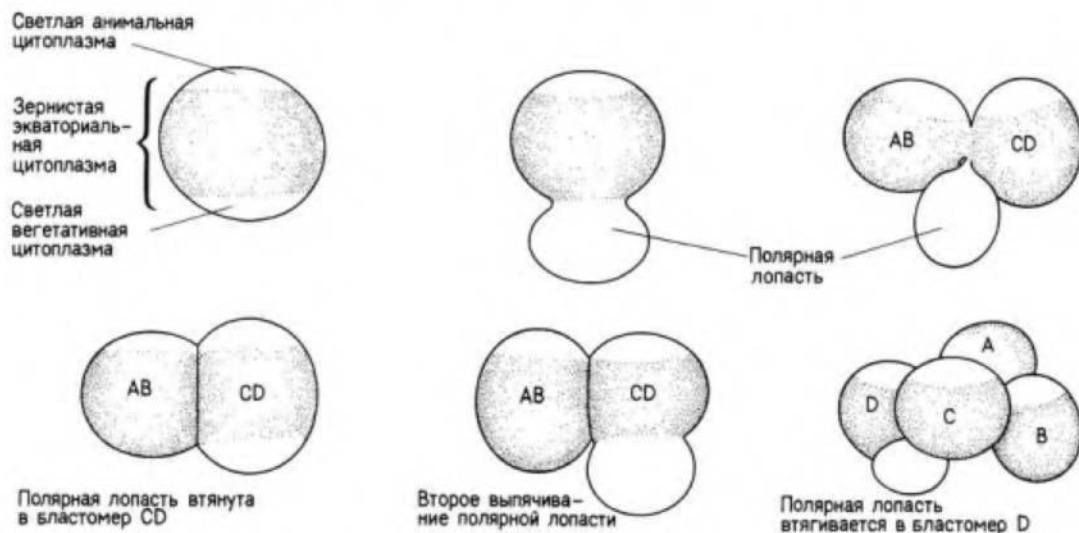


Рис. 7.11. Дробление у моллюска *Dentalium*. Образование полярной лопасти и ее втягивание происходят дважды. (Из Wilson, 1904.)

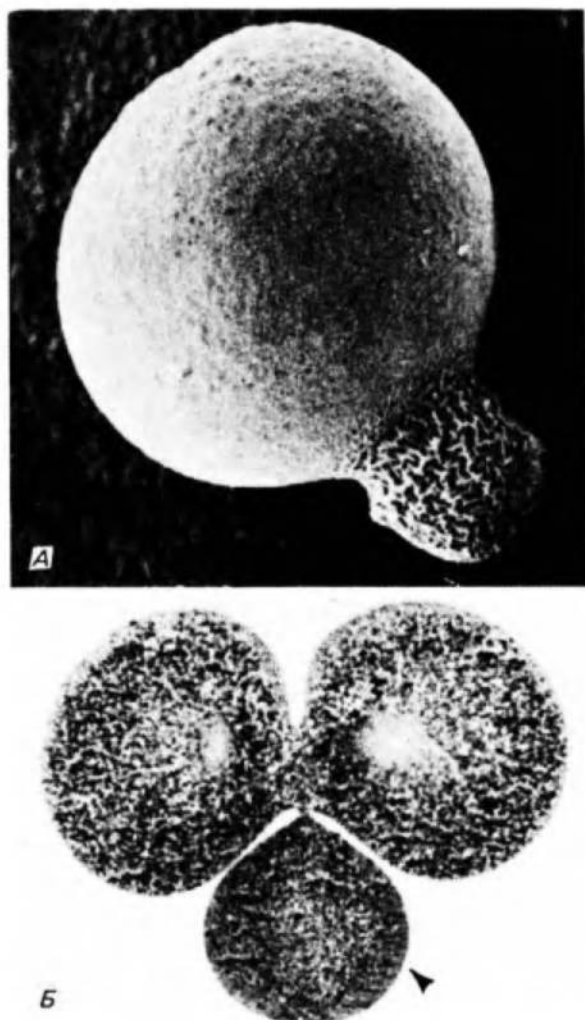


Рис. 7.12. Полярные лопасти у моллюсков. А. Выступающая полярная лопасть в недробящемся яйце *Buccinum undatum*. Складки на поверхности наблюдаются только в области полярной лопасти. (Фотография получена с помощью сканирующего электронного микроскопа.) Б. Срез через зародыш *Dentalium* на стадии двух бластомеров. Стрелка указывает на большую полярную лопасть. (Фотографии с любезного разрешения M. R. Dohmen.)

перетекала в полярную лопасть и замещала удаленную порцию; при этом последующее развитие зародышей было нормальным. В дополнение к этому, когда он добавлял жидкую цитоплазму полярной лопасти в бластомер В, удвоения структур не наблюдалось (Verdonk, Cather, 1983). Следовательно, жидкая часть цитоплазмы не содержит этих морфогенетических детерминантов. Они, вероятно, находятся в нерастворимой кортикальной цитоплазме или в цитоскелете.

Клемент изучал также развитие бластомера

Д с целью проследить дальнейшее распределение этих детерминантов. Развитие бластомера Д представлено на рис. 7.13. Этот макромер, получивший содержимое полярной лопасти, крупнее трех других. После удаления бластомера Д или его первого или второго производных (1Д или 2Д) из оставшихся бластомеров развивается неполная личинка, у которой отсутствуют сердце, кишечник, парус (снабженный ресничками край личинки), раковинная железа, глаза и нога. Если удалить бластомер 3Д после деления бластомера 2Д, приводящего к образованию бластомера 3Д, то получаются почти нормальные зародыши, имеющие глаза, ногу, парус, а некоторые и раковинную железу, но лишенные сердца или кишечника (рис. 7.14). Следовательно, некоторые из морфогенетических детерминантов, первоначально находившиеся в бластомере Д, перешли в клетку 3д. После того как образовалась клетка 4д (после деления бластомера 3Д), удаление производного бластомера Д (клетки 4Д) не вызывает качественных изменений в развитии. Все детерминанты, важные для формирования сердца и кишечника, теперь содержатся в бластомере 4д, и удаление именно этой клетки приводит к образованию личинки без сердца и кишки (Clement, 1986). Бластомер 4д ответствен за формирование (при его последующем делении) двух мезентобластов – клеток, из потомства которых образуются как мезодермальные (сердце), так и энтодермальные (кишечник) органы.

Материал полярной лопасти также ответствен за организацию дорсовентральной (спина–живот) полярности зародыша. Если позволить материалу полярной лопасти перейти в оба бластомера (АВ и СД), то образуются личинки-близнецы, соединенные между собой на вентральной поверхности (Guerrier et al., 1978; Henry, Martindale, 1987).

Таким образом, опыты показали, что нерастворимая цитоплазма полярной лопасти чрезвычайно важна для нормального развития моллюсков, потому что она:

- 1) содержит детерминанты для соответствующего ритма и ориентации делений дробления бластомера Д;
- 2) содержит определенные детерминанты (поступающие в бластомер 4д и приводящие затем к образованию мезентобластов), необходимые для дифференцировки мезодермы и кишечника;
- 3) ответственна за запуск индукционных взаимодействий (через материал, поступающий в бластомер 3д), приводящих к формированию раковинной железы и глаза;
- 4) содержит детерминанты, необходимые для спецификации дорсовентральной оси зародыша.

Хотя очевидно, что полярная лопасть важна для

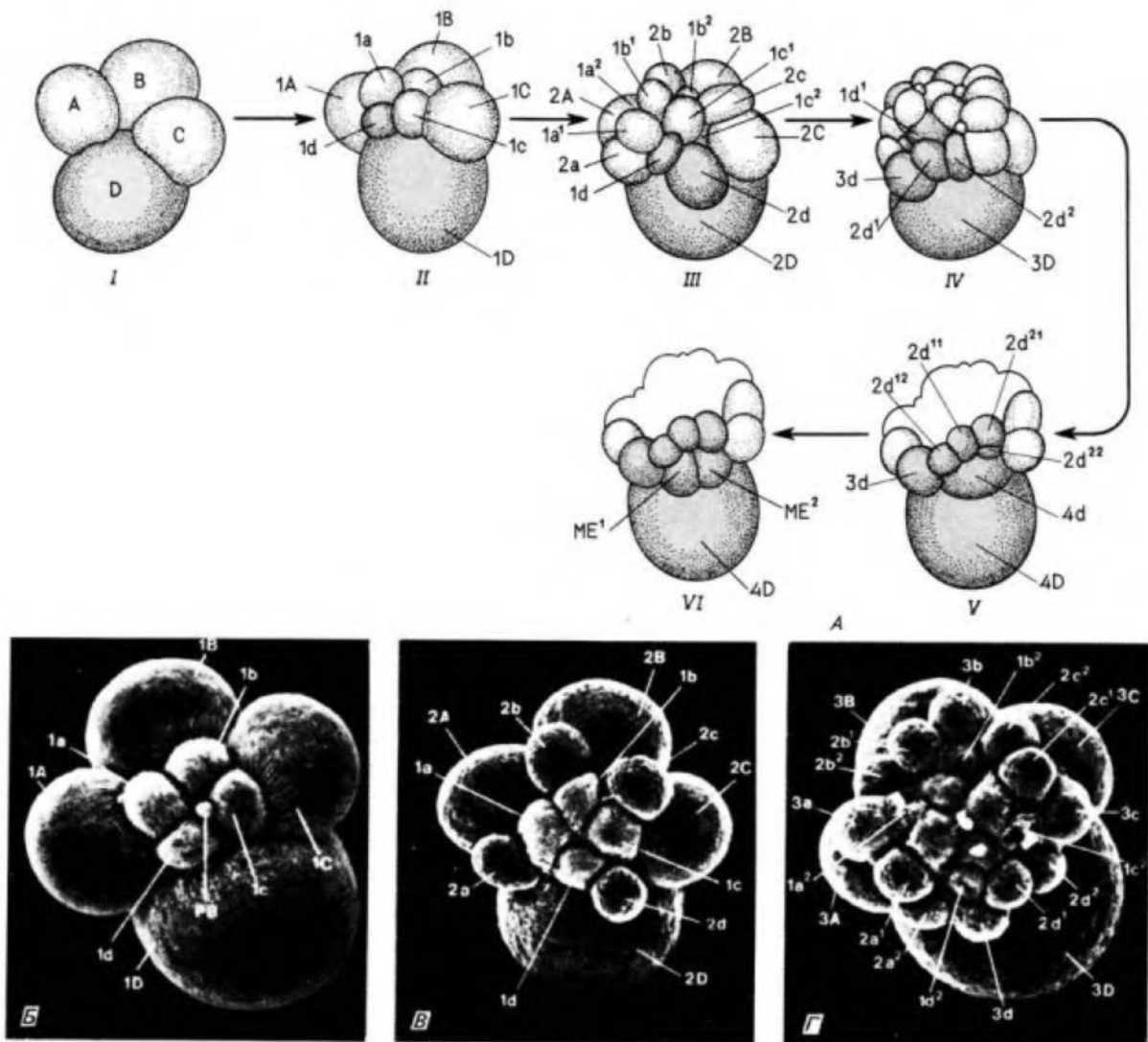


Рис. 7.13. Развитие бластомера D. А. Схематическое изображение клеточной линии бластомера D у зародышей *Hyanassa*: I. 4-клеточный зародыш. II. Бластомеры 1D и 1d на 8-клеточной стадии. III. Зародыш на 16-клеточной стадии, содержащий бластомеры 2D и 2d (происходящие от 1D). Клетки, происходящие из D (серые), часто делятся позднее других. IV. Деление макромера 2D с образованием клеток 3d и 3D; клетка 2d делится на 2d¹ и 2d². V. Стадия 64 клеток. Из бластомера 3D образуются клетки 4D и 4d. VI. Бластомер 4d делится симметрично, в результате чего возникают два мезэнтобласта, ME¹ и ME². Б. 8-клеточный зародыш. В. 12-клеточный зародыш (2a–1d еще не делились). Г. 32-клеточный зародыш. (А – по Clement, 1962; фотографии из Craig, Morrill, 1986 с любезного разрешения авторов.)

нормального развития улитки, мы все еще не знаем механизма ее действия. По-видимому, существенных различий в синтезе мРНК или белков у зародышей с полярной лопастью и без нее не наблюдается (Brandhorst, Newrock, 1981; Collier, 1983, 1984). Возможный ключ к пониманию этого механизма дали наблюдения (Atkinson, 1987), показавшие наличие дифференцированных клеток паруса, пищеварительной системы и раковинной железы у зародыша без полярной лопасти. У такого зародыша

могут образовываться эти клетки, но они оказываются неспособными организовать функциональные ткани и органы. Можно обнаружить в зародыше ткани пищеварительного тракта, но они не соединены между собой в целую систему, а миоциты рассеяны по личинке и также не организованы в функциональную мышечную ткань. Таким образом, функции полярной лопасти в развитии могут быть очень сложными.

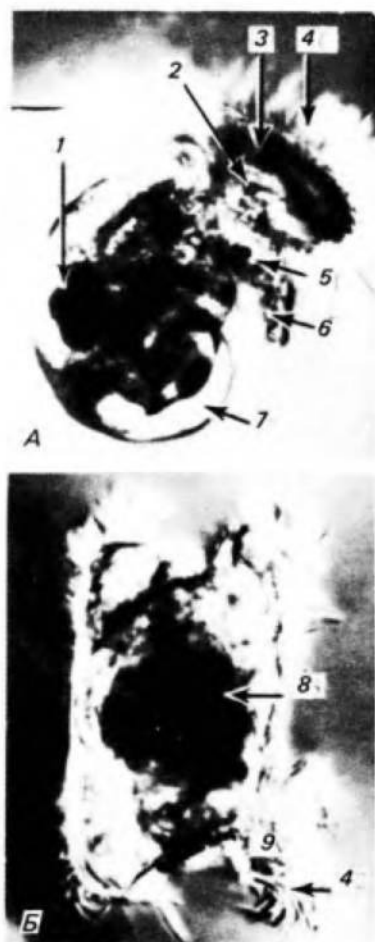


Рис. 7.14. Значение полярной лопасти в развитии *Ilyanassa*. А. Нормальная личинка велигер (парусник). Б. Аномальная личинка, образующаяся из зародыша, у которого удалена полярная лопасть blastomeres D. 1—остаток желтка; 2—глаз; 3—парус; 4—реснички паруса; 5—статоцист (орган равновесия); 6—нога; 7—раковина; 8—вывернутый наизнанку стомодеум; 9—парус с нарушенной структурой. (Из Newrock, Raff, 1975; фотографии с любезного разрешения К. Newrock.)

Детерминация у нематоды *Caenorhabditis elegans*

Для анализа закономерностей развития необходимы подходящие объекты изучения. Долгое время одним из излюбленных объектов эмбриологических исследований служили морские ежи, потому что их гаметы легко получать в больших количествах, их яйца и зародыши прозрачны, а оплодотворение и развитие могут происходить в лабораторных условиях. Но в условиях лаборатории трудно вырастить больше одного поколения морских ежей, а это делает практически невозможными генетические исследования. Генетики же (по меньшей мере те из них, кто работает с многоклеточными эукариотами) предпочитают дрозофилу. Короткий жизненный цикл, легкость разведения и наличие полигенных хромосом у личинки мухи (позволяющих изучать локализацию генов) делают это животное в высшей степени подходящим для генетического анализа. Однако эмбриогенез дрозофилы очень сложен и его трудно изучать. Исследовательской группе, возглавляемой Сиднеем Бреннером (Brenner, 1974), удалось найти организм, у которого можно идентифицировать каждый ген, участвующий в развитии, и в то же время проследить судьбу клеток, происходящих от каждой единичной клетки. Это мелкая (1 мм), свободно живущая почвенная нематода *Caenorhabditis elegans* (рис. 7.15). Продолжительность эмбриогенеза у нее невелика (около 16 ч), все развитие может завершиться в чашке Петри, число образующихся типов клеток также невелико. Этот червь является гермафродитом—каждая особь содержит и яйца, и спермии. Размножение происходит путем либо перекрестного оплодотворения, либо самооплодотворения. Тело гермафродитного *C. elegans* содержит точно 959 соматических клеток, происхождение которых может быть полностью картировано с помощью наблюдений через прозрачную кутикулу (рис. 7.16; Sulston, Horvitz, 1977; Kimble, Hirsh, 1979). Кроме того, в отличие от позвоночных клеточные линии *C. elegans* почти не меняются от



Рис. 7.15. *Caenorhabditis elegans*. Схематическое изображение взрослого гермафродита. На ранних стадиях развития формируются спермии. Эти спермии накапливаются в течение более поздних стадий, так что зрелое яйцо на своем пути к вульве проходит через них. Таким способом у гермафродитной особи собственные яйца оплодотворяются собственными спермиями. (По Sulston, Horvitz, 1977.)

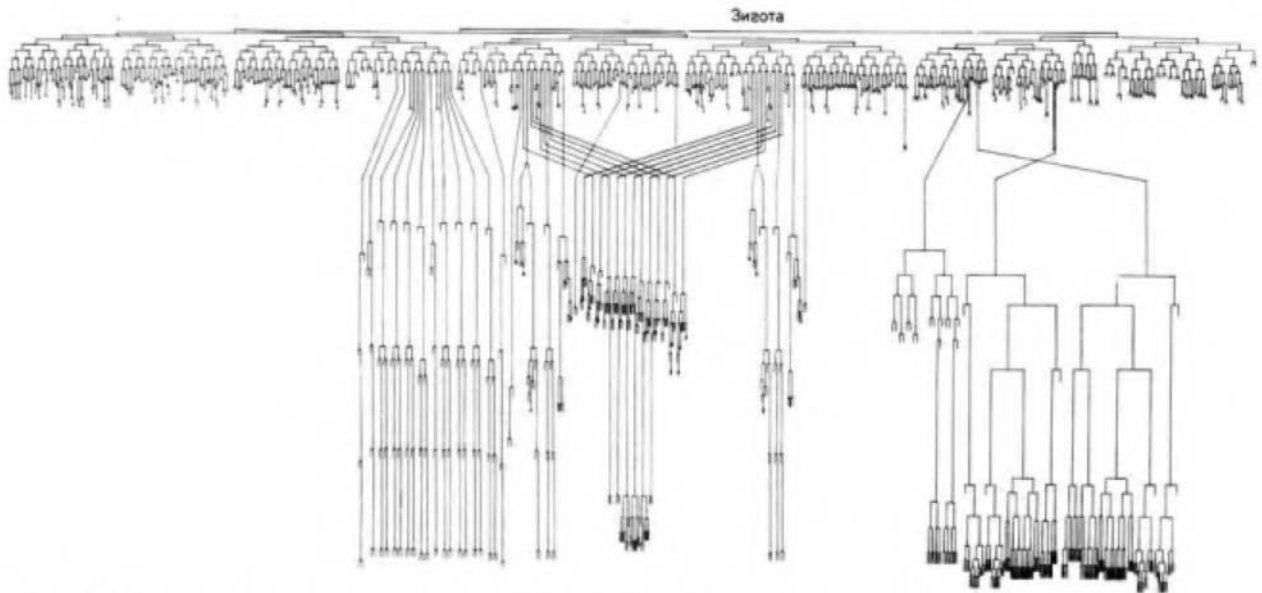


Рис. 7.16. Полная карта клеточных линий для *C. elegans*. Каждая вертикальная линия представляет собой одну клетку, каждая горизонтальная — одно клеточное деление. (Из Sulston et al., 1983.)

одной особи к другой. В их развитии мало места для случайности (Sulston et al., 1983). (Это является следствием пространственной упорядоченности цитоплазматической сегрегации.) *C. elegans* также имеет небольшое для многоклеточного организма число генов — около 3000, что примерно в 35 раз меньше, чем у млекопитающих.

Локализация цитоплазматических веществ у этого вида была продемонстрирована в убедительных и изящных опытах. Одним из таких веществ являются **гранулы первичных половых клеток** и их потомков (**P-гранулы**), которые вскоре после оплодотворения перераспределяются в зиготе и локализуются исключительно в тех клетках, которые спо-

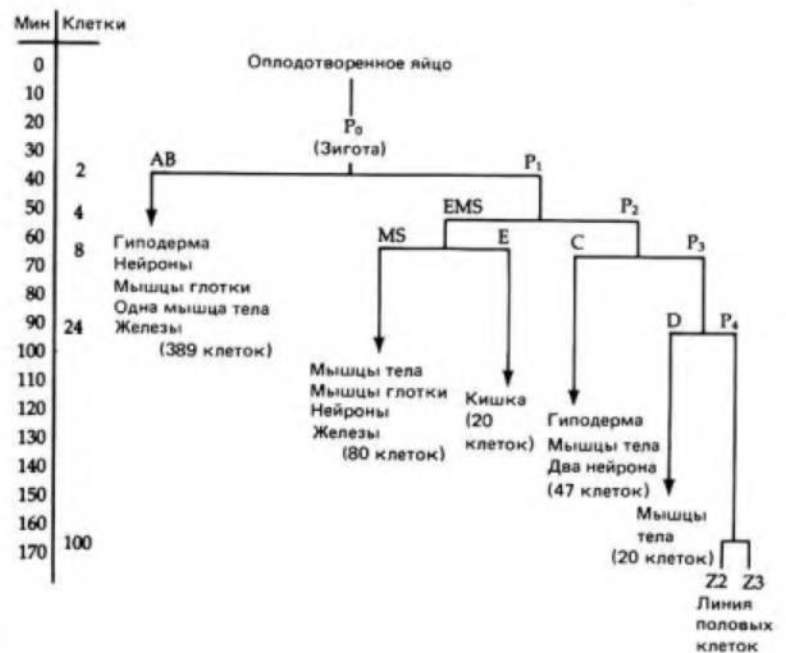


Рис. 7.17. Карта клеточных линий для *C. elegans* в сокращенном виде. Главное внимание уделено линии предшественников половых клеток (P₀–P₄), которые получают P-гранулы. Числа, указанные в скобках, относятся к тем клеткам, которые имеются у только что вылупившейся личинки. Некоторые из этих клеток продолжают делиться, и таким образом формируются 959 соматических клеток взрослого червя. (По Strome, Wood, 1982; с любезного разрешения W. Wood.)

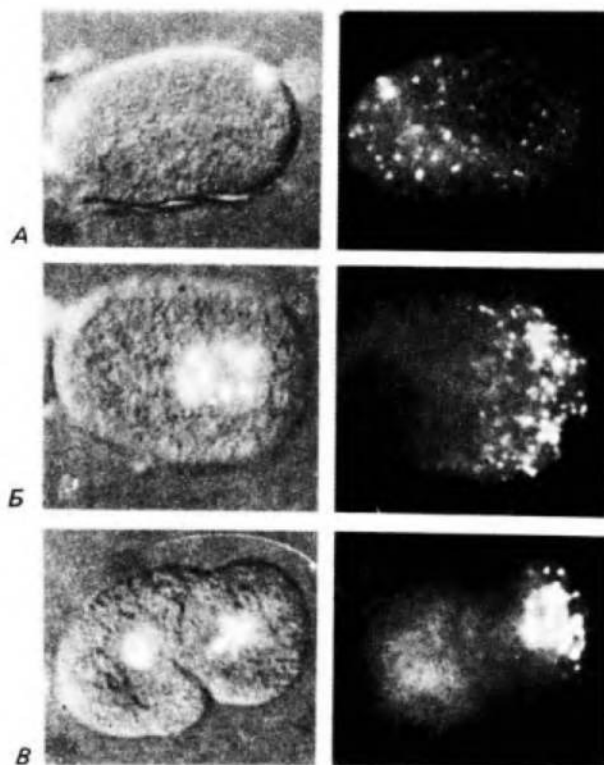


Рис. 7.18. Асимметричная локализация Р-гранул в период оплодотворения и первого деления дробления. На рисунках слева представлены яйца, окрашенные на содержание ДНК; на рисунках справа — те же яйца, окрашенные флуоресцирующими антителами к белку Р-гранул. А. Зигота до начала миграции пронуклеусов; видно, что гранулы более или менее равномерно распределены по всей зиготе. Б. По мере сближения пронуклеусов гранулы мигрируют к заднему концу зиготы. В. Двухклеточный зародыш, в котором бластомер P_1 вступил в профазу митоза, а Р-гранулы передвинулись в задний конец клетки. (Из Strome, Wood, 1983; фотографии с любезного разрешения S. Strome.)

способны к формированию гамет (рис. 7.17). Используя связанные флуоресцирующие антитела к компонентам Р-гранул, Штром и Вуд (Strome, Wood, 1983) показали, что во время миграции пронуклеусов случайно рассеянные в цитоплазме Р-гранулы локализуются в заднем отделе зиготы (двигаясь к месту проникновения спермия) и попадают только в бластомер P_1 , формирующийся из цитоплазмы, находящейся в этом отделе (рис. 7.18 и цветная таблица на внутренней стороне обложки книги). При последующем делении дробления Р-гранулы до начала митоза рассеиваются по всей цитоплазме бластомера P_1 , но во время митоза снова мигрируют к заднему концу клетки. Здесь они оказываются сосредоточенными в бластомере P_2 . В конце концов

Р-гранулы локализуются в бластомере P_4 , потомки которого станут яйцами и спермиями взрослого животного.

Для движения Р-гранул необходимы микрофиламенты, но оно может происходить в отсутствие микротрубочек. Обработка зиготы цитохалазином D (ингибитором образования микрофиламентов) предотвращала сегрегацию этих гранул на заднем конце клетки, тогда как демекोलлин (сходный с колхицином ингибитор образования микротрубочек) не останавливал их движения (Strome, Wood, 1983). Достигнув заднего участка зиготы, Р-гранулы остаются там, даже если микрофиламенты после этого разрушаются (Hill, Strome, 1987). Механизмы движения Р-гранул и их прикрепления к микрофиламентам до сих пор неизвестны.

Характер развития большинства клеток *C. elegans* является типично мозаичным; их судьба строго детерминирована внутренними цитоплазматическими факторами, а не взаимодействиями между соседними клетками. Так, детерминанты для линии клеток, из которых образуется кишка, во время первого деления дробления локализованы в клетке P_1 , из которой позже образуется клетка-предшественник кишки (клетка E) (рис. 7.19; Laufer et al., 1980; Edgar, McGhee, 1986). Однако, как и у оболочников, у нематод сохраняется некоторая возможность клеточных взаимодействий. Кимбл (Kimble, 1981) использовал пучок лазерных лучей, чтобы избирательно убить специфические клетки, потомки которых формируют вульву (проход, через который происходит откладка яиц). Одна из клеток в этой области становится **якорной клеткой**, соединяющей лежащую над ней гонаду с вульвой. Если эту клетку разрушить, то гиподермальные (кожные) клетки не делятся и не образуют вульвы. Однако, пока якорная клетка находится вблизи гиподермы, вульва формируется. Это свидетельствует о том, что якорная клетка индуцирует образование вульвы (рис. 7.20). Кроме того, шесть клеток-предшественников вульвы под влиянием якорной клетки формируют **эквивалентную группу**. В процессе нормального развития три центральные клетки этой группы делятся, образуя вульву, тогда как из трех других клеток образуются шесть гиподермальных клеток. (Если якорная клетка разрушена, то все шесть клеток эквивалентной группы делятся один раз, в результате чего возникают 12 гиподермальных клеток.) Если разрушить три центральные клетки, то три другие клетки, которые в норме образуют гиподерму, дадут начало клеткам вульвы. Таким образом, как мы уже видели на примере оболочников и улиток, явления регуляции и индукции до некоторой степени встречаются и у организмов, эмбриональное развитие которых жестко детерминировано.

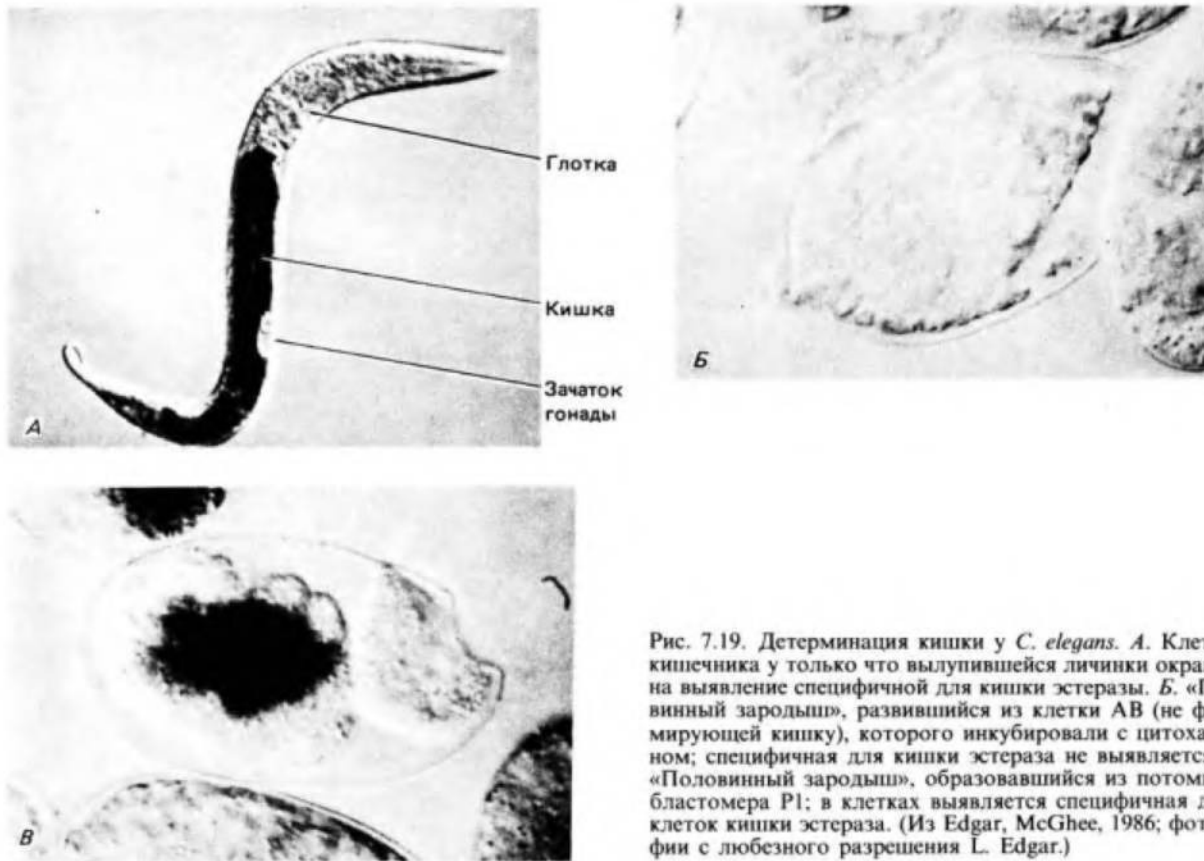


Рис. 7.19. Детерминация кишки у *C. elegans*. А. Клетки кишечника у только что вылупившейся личинки окрашены на выявление специфичной для кишки эстеразы. Б. «Половинный зародыш», развившийся из клетки АВ (не формирующей кишку), которого инкубировали с цитохалазином; специфичная для кишки эстераза не выявляется. В. «Половинный зародыш», образовавшийся из потомков бластомера Р1; в клетках выявляется специфичная для клеток кишки эстераза. (Из Edgar, McGhee, 1986; фотографии с любезного разрешения Л. Edgar.)

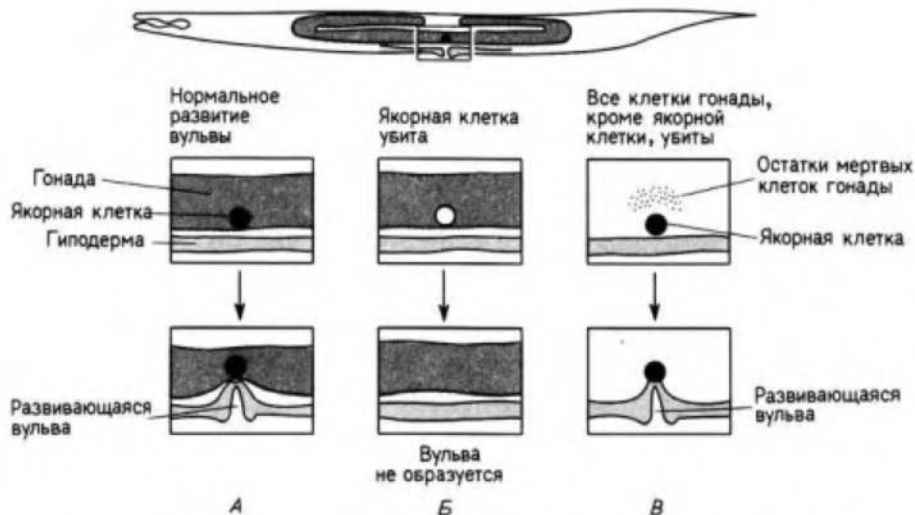


Рис. 7.20. Индукция у *C. elegans*. Схема опытов, демонстрирующих необходимость якорной клетки для формирования вульвы. (По Alberts et al., 1983.)

Цитоплазматическая локализация детерминантов половых клеток

Локализованные в цитоплазме детерминанты обнаружены во всем животном царстве. Наиболее часто встречающиеся детерминанты – это те, которые ответственны за детерминацию предшественников половых клеток, т.е. клеток, потомки которых дают начало гаметам. Даже у многих зародышей, раннее развитие которых является в основном регуляционным, клетки, содержащие определенные участки цитоплазмы, предназначены стать предшественниками половых клеток.

Детерминация половых клеток у нематод

Теодор Бовери (1862–1915) был первым ученым, наблюдавшим поведение хромосом в процессе эмбриогенеза. Изучая развитие аскариды *Parascaris aequorum* (ее прежнее название *Ascaris megalocephala*), он обнаружил любопытные особенности. Эта нематода имеет всего две хромосомы в гаплоидной клетке, что позволяет проводить детальные наблюдения над индивидуальными хромосомами. Плоскость первого деления дробления у этого животного необычна тем, что проходит по экватору, разделяя яйцо на два бластомера – анимальный и вегетатив-

ный (рис. 7.21, А). Однако еще более странным оказалось поведение хромосом во время последующего деления этих двух первых бластомеров. Непосредственно перед следующим делением анимального бластомера концы его хромосом распадаются на десятки фрагментов. Не все фрагменты включаются затем в хромосомы образующихся ядер. В результате клетки утрачивают огромное число генов (Tobler et al., 1972). Это явление называется **элиминацией хромосом** или **диминуцией** хроматина. Между тем в вегетативном бластомере диминуции хроматина не происходит. Во время второго деления анимальная клетка делится меридионально, тогда как вегетативная клетка – опять экваториально. Обе клетки, происходящие из вегетативного бластомера, имеют нормальные хромосомы. Однако перед третьим делением хромосомы одного из двух вегетативных бластомеров, расположенного более анимально, фрагментируются. Таким образом, на 4-клеточной стадии только одна клетка, занимающая наиболее вегетативное положение, содержит полный набор генов. В течение последующих делений вплоть до 16-клеточной стадии происходит разделение линии соматических клеток, в которых произошла диминуция хроматина, и только в двух клетках хроматин не подвергся диминуции. Один из этих двух бластомеров дает начало первич-

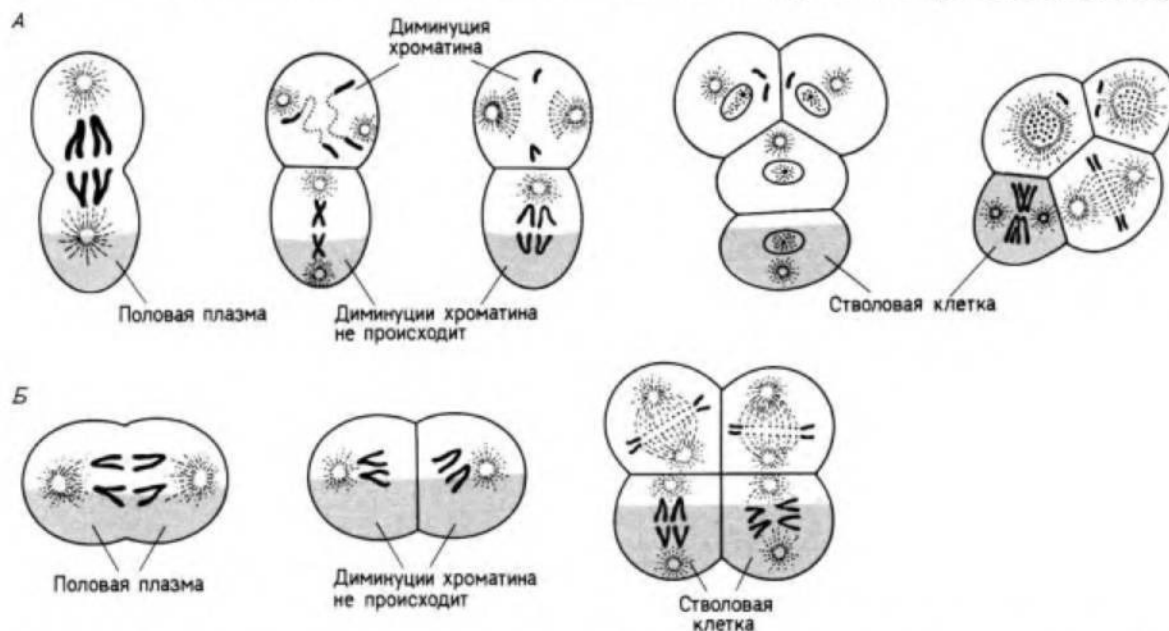


Рис. 7.21. Распределение половой (зародышевой) плазмы (показана серым цветом) в период дробления нормальной (А) и центрифугированной (Б) зигот *Parascaris*. А. Зародышевая плазма в норме сохраняется только в одном, вегетативном бластомере; об этом свидетельствует отсутствие в нем диминуции хроматина. Таким образом, на 4-клеточной стадии зародыш имеет одну стволовую клетку для гамет. Б. Если плоскость первого деления дробления смещают с помощью центрифугирования на 90°, то зародышевая плазма оказывается в обеих дочерних клетках и ни у одной из них не происходит диминуции хроматина. После второго деления эти две клетки становятся клетками – предшественниками гамет. (По Waddington, 1966.)

ным половым клеткам; в другом в конечном итоге также происходит диминуция хроматина и из него формируются соматические клетки. Хромосомы сохраняются интактными только в тех клетках, которым предназначено формировать линии половых клеток. В противном случае количество генетической информации должно было бы уменьшаться в каждом последующем поколении. Клетки, в которых происходит диминуция хроматина, дают начало соматическим клеткам.

Бовери называли последним великим наблюдателем в эмбриологии и первым из великих экспериментаторов (Шлеман и Вильсон посвятили ему свои главные книги). Не довольствуясь одним наблюдением того, что полный набор хромосом сохраняется лишь в половых клетках, Бовери решил проверить, не защищает ли хроматин от диминуции цитоплазма этой специфической области. Если такое предположение правильно, то любое ядро, попавшее в эту область, должно оказаться под ее защитой. С целью проверки своей гипотезы Бовери (1910) центрифугировал яйца *Parascaris* незадолго до первого деления дробления. Эта процедура вызывала изменение ориентации митотического веретена. Если веретено формировалось перпендикулярно к его нормальной ориентации, то оба образовавшихся затем blastomeres должны были содержать

некоторое количество вегетативной цитоплазмы (рис. 7.21, Б). И действительно, Бовери обнаружил, что после первого деления ни в одном из ядер не происходило диминуции хроматина. Однако следующее деление было экваториальным — по анимально-вегетативной оси. В двух возникших в результате деления анимальных blastomeres произошла диминуция хроматина, тогда как в двух вегетативных клетках ее не было. Исходя из этого, Бовери пришел к выводу, что вегетативная цитоплазма содержит фактор (или факторы), который защищает ядра от диминуции хроматина и детерминирует судьбу этих клеток, предназначая их для образования половых клеток.

Детерминация половых клеток у насекомых

Яйца некоторых насекомых также содержат зародышевую плазму, функция которой, по-видимому, очень сходна с функцией зародышевой плазмы у *Parascaris*. У галлицы *Wachtiella persicariae* большая часть ядер утрачивает 32 из 40 исходных хромосом! Однако на заднем полюсе яйца находятся два ядра, в которых не происходит диминуции хроматина и которые в течение некоторого времени не делятся (рис. 7.22). Потомки этих двух ядер в конечном счете включаются в первичные половые

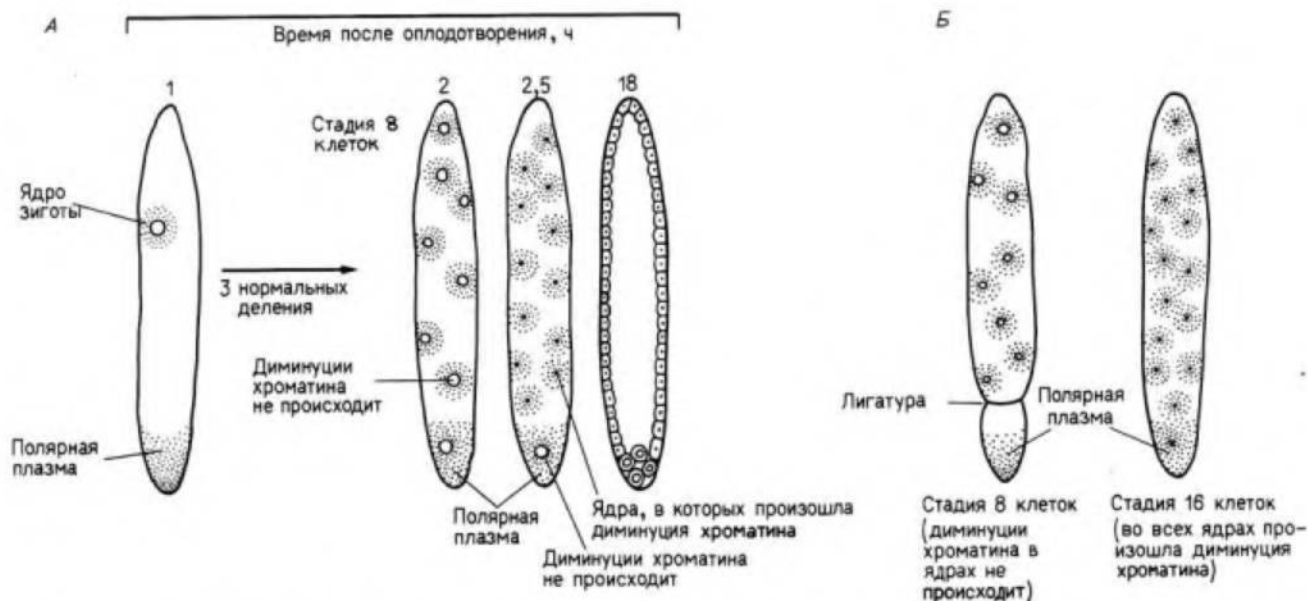


Рис. 7.22. Сегрегация линии половых клеток и диминуция хроматина у *Wachtiella*. А. Диминуция хроматина зависит от положения ядер. Первые три деления являются нормальными. После этого все ядра, за исключением одного, лежащего на заднем полюсе яйца, теряют 32 из 40 хромосом. Б. Если на стадии 8 клеток в области заднего полюса зародыша наложить лигатуру так, чтобы ни одно ядро не могло войти в эту область, то во всех ядрах на стадии 16 клеток происходит диминуция хроматина, даже если связь с полярной плазмой восстановлена. (По Geyer-Duszyńska, 1959.)

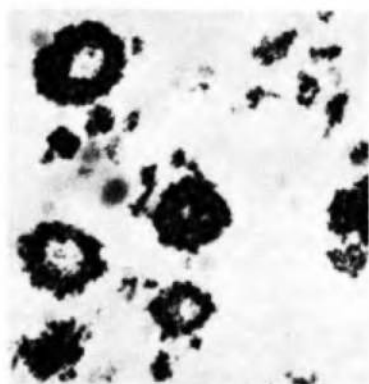


Рис. 7.23. Полярные гранулы из фракционированных полярных клеток дрозофилы. Микрофотография получена с помощью просвечивающего электронного микроскопа. (С любезного разрешения А. Р. Mahowald.)

клетки¹. Если препятствуют миграции этих ядер в область заднего полюса путем наложения лигатуры, то в каждом ядре происходит диминуция хроматина и возникающая из такого яйца галлица оказывается стерильной. Если ослабить лигатуру и позволить таким ядрам переместиться в область заднего полюса, то первичные половые клетки образуются, но они никогда не становятся функциональными гаметами (Geyer-Duszynska, 1959). Было показано (Kunz et al., 1970), что элиминированный хроматин содержит гены, являющиеся активными в период образования первичных половых клеток.

Герминативная цитоплазма насекомых отличается от любой другой цитоплазмы яйца. Хегнер (Hegner, 1911) обнаружил, что при удалении или разрушении этой области до формирования клеток на заднем полюсе яиц некоторых жуков зародыши, развившиеся из таких яиц, не имеют половых клеток и оказываются стерильными. Очень удачно, что эта задняя **полярная плазма** маркирована **полярными гранулами** (рис. 7.23). Роль этих гранул в детерминации половых клеток неизвестна, однако их постоянная связь с полярной плазмой и с происходящими из нее **полярными клетками** делает полярные гранулы удобными маркерами этой области яйца. Данную область полярных клеток легко идентифицировать с помощью сканирующего электронного микроскопа (рис. 7.24).

¹ Пример галлицы и *Parascaris* выглядит как очень убедительное доказательство в пользу гипотезы Вейсмана о сегрегации ядерных детерминантов (которая обсуждается в гл. 8). Эти случаи диминуции хроматина и элиминации хромосом являются исключениями из общего правила (гл. 9 и 10), поскольку обычно в ядрах дифференцированных клеток сохраняются неиспользуемые гены; мы не располагаем данными о том, что в различных соматических клетках *Wachtliella* или *Parascaris* сохраняются разные части их генома.

Современные исследования полярной цитоплазмы проводятся преимущественно на зародышах дрозофилы. В течение первых двух часов после оплодотворения зародыш дрозофилы развивается как **синцитий**. Иными словами, происходит только деление ядер без соответствующего деления цитоплазмы. В результате формируется **слой неклеточной синцитиальной бластодермы**, содержащий около 3500 ядер. Каждое ядро окружается клеточной мембраной, и бластодермальный слой становится **клеточной бластодермой**. Опыты по трансплантации (Zalokar, 1971; Illmensee, 1968, 1972) показали, что все ядра синцития эквивалентны и тотипотентны. Однако клетки в клеточной бластодерме строго детерминированы. К сходному заключению пришли и другие исследователи (Schubiger, Wood, 1977), которые накладывали лигатуры на яйца дрозофилы, находящиеся на разных стадиях развития. В ядрах дрозофилы диминуции хроматина не происходит и ядро синцитиальной стадии может дать начало либо первичным половым, либо соматическим клет-



Рис. 7.24. Полярные клетки зародыша дрозофилы непосредственно перед завершением делений дробления. Они видны на верхнем конце зародыша. Фотография получена с помощью сканирующего электронного микроскопа. (С любезного разрешения А. Р. Mahowald.)

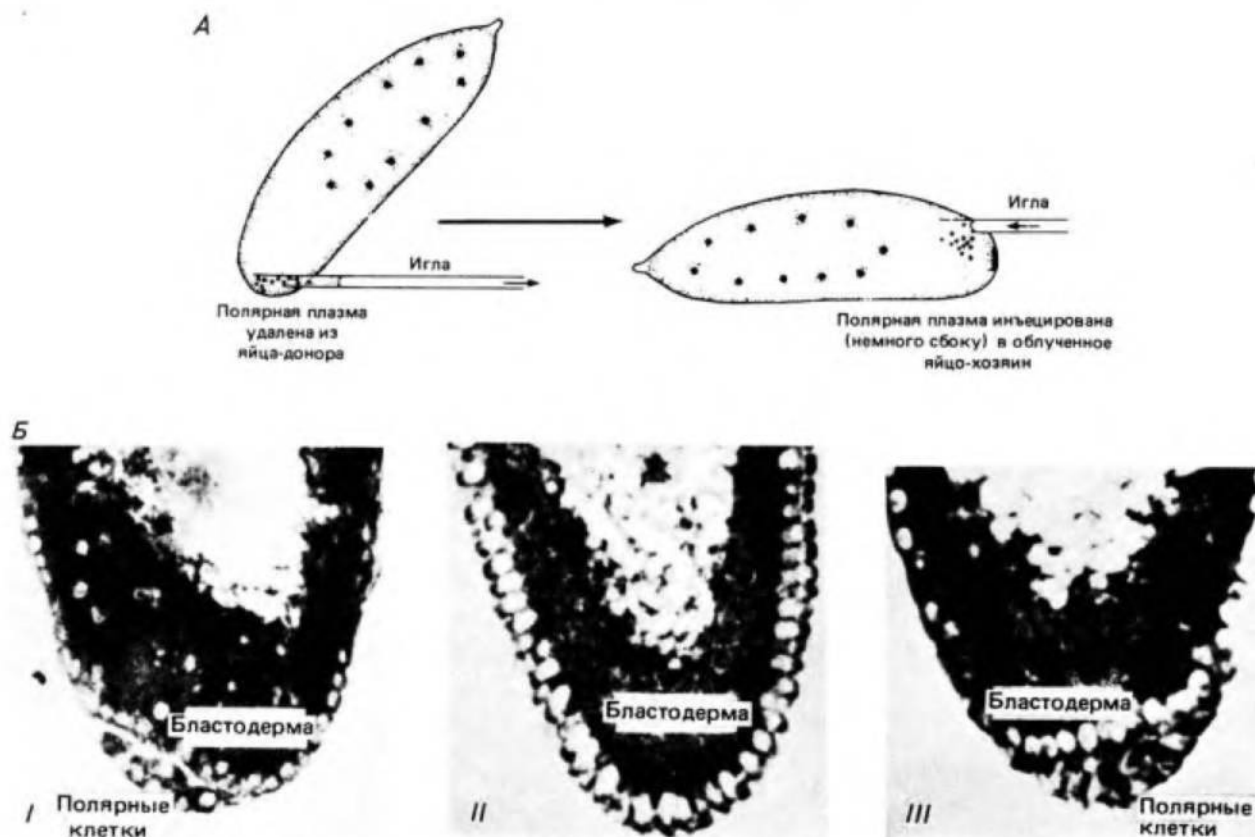


Рис. 7.25. Способность полярной плазмы «излечивать» зародыш от индуцированной облучением стерильности. *А.* Методика трансплантации полярной плазмы от необлученного донора к облученному хозяину. *Б.* Продольные срезы через заднюю область зародыша дрозофилы, фиксированного к моменту завершения периода дробления. *І* – нормальный зародыш с бластодермой и полярными клетками; *ІІ* – зародыш, который был облучен на ранней стадии дробления; бластодерма сформировалась, но полярные клетки отсутствуют; *ІІІ* – зародыш, облученный на ранних стадиях дробления, которому затем инъецировали полярную плазму от нормального зародыша. Видны бластодерма и полярные клетки. (Из Okada et al., 1974.)

кам. Их детерминация зависит от области яйца, в которую они мигрируют. Одной из этих областей является задняя полярная плазма. Таким образом, полярная плазма, по-видимому, содержит морфогенетические детерминанты для образования половых клеток.

Было обнаружено (Geigy, 1931), что облучение полярной плазмы ультрафиолетом приводит к стерильности мух, развившихся из облученных яиц, а Окада и др. (Okada et al., 1974), продолжившие эту линию исследований, показали, что введение полярной плазмы из необлученных зародышей-доноров в облученные яйца устраняет их стерильность (рис. 7.25). Введение любой другой части цитоплазмы в их опытах не приводило к такому результату.

В том же, 1974 г. автономность этой цитоплазматической области и ее способность детерминировать любое ядро дрозофилы была доказана остро-

умными опытами Илменси и Мэховалда (Illmensee, Mahowald, 1974). В этих опытах (рис. 7.26) неправдоподобно малое количество (5–100 пиколитров) энуклеированной полярной плазмы было перенесено из яиц дрозофилы дикого типа (донор) в область *переднего* полюса генетически маркированных яиц (хозяин) до их целлюляризации. (Эти яйца хозяина несли хромосомные мутации *multiple wing hair (mwh)* и *ebony (e)*.) После формирования клеточной бластодермы клетки переднего полюса зародыша-хозяина напоминали нормальные полярные клетки заднего полюса, содержали включенные в них полярные гранулы и их морфология была типичной для нормальных полярных клеток. Чтобы проверить, станут ли эти клетки предшественниками функциональных половых клеток, Мэховалд и Илменси трансплантировали модифицированные клетки переднего полюса в заднюю область дробящихся зародышей, содержащих свои собственные генети-

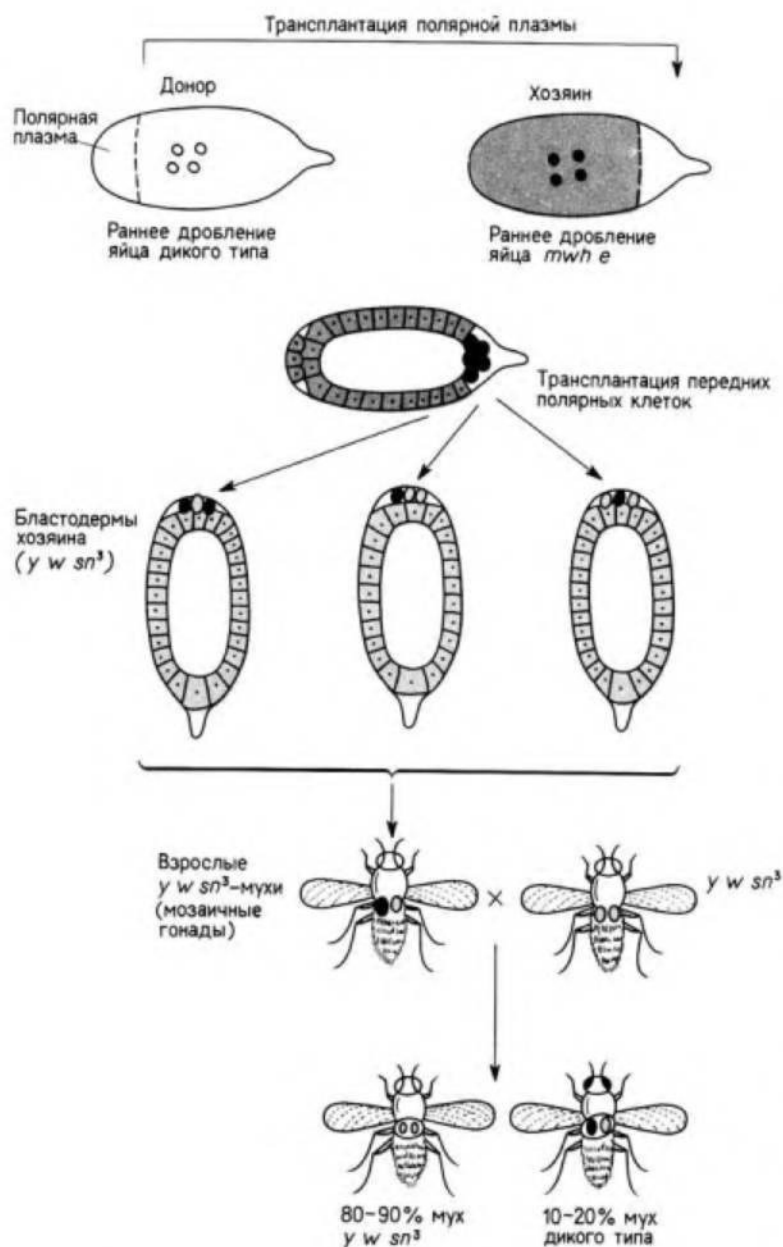


Рис. 7.26. Способность зародышевой (полярной) плазмы детерминировать судьбу клеток, которые ее содержат. Полярную плазму яйца дрозофилы дикого типа (белое) инъецировали в передний (но не в задний) полюс генетически маркированных (мутантных) зародышей (обозначен темно-серым цветом). Образовавшиеся на переднем полюсе клетки напоминали нормальные клетки – предшественники половых клеток, которые видны на заднем полюсе. Эти передние полярные клетки затем трансплантировали в область заднего полюса зародыша-хозяина (обозначен светло-серым цветом), маркированно-го другими мутациями так, что потомки этих клеток могли мигрировать в гонады. Когда этих мух спаривали с мухами, несущими ту же вторую группу маркеров (но не имевшими трансплантированных клеток), часть потомства оказывалась дикого типа. Следовательно, половые клетки такого потомства произошли не от родительской линии мух. (По Illmensee, Mahowald, 1974.)

чески маркированные полярные клетки¹. Эти новые зародыши-хозяева были маркированы по другим мутациям – рецессивным *yellow* (*y*), *white* (*w*) и *singed* (*sn*³). Все мухи, развившиеся из таких зародышей, несли мутации *yellow*, *white* и *singed*. Этих мух

¹ Это было сделано для того, чтобы дать им возможность включиться в развивающуюся гонаду. Имеются данные, полученные на других организмах, о том, что полярная плазма содержит также детерминанты для соответствующей миграции половых клеток в гонады (Züst, Dixon, 1977; Ikenishi, Kotani, 1979).

скрестили с другими мухами, несущими такие же мутации. В большинстве случаев (88 из 92 скрещиваний) в потомстве появились особи, идентичные обоим родителям. Однако в четырех случаях возникли потомки дикого типа. Их появление указывало на то, что некоторые половые клетки у этих мух произошли из трансплантированных клеток, следовательно, половая плазма одного зародыша была способна побудить ядра клеток в области переднего полюса другого зародыша детерминировать развитие функциональных половых клеток! Использован-

ная методика оказалась также полезной для установления времени локализации этого детерминанта. Илменси и др. (Illmensee et al., 1976) обнаружили, что детерминант первичных половых клеток способен функционировать до оплодотворения и локализуется в развивающемся ооците примерно в то же самое время, когда желток достигает его заднего конца.

Сама природа предоставляет в наше распоряжение свидетельства о значении полярной плазмы и полярных гранул для развития половых клеток. Самка дрозофилы, гомозиготная по мутации *grandchildless*, продуцирует фенотипически нормальное, но стерильное потомство [*GG* (самец) $\times$ *gg* (самка) $\rightarrow$ *Gg* (стерильный)]. Мэховалд и др. (Mahowald et al., 1979) показали, что если таких самок спарить с нормальными самцами, то ядра зародышей, получившихся в результате скрещивания, никогда не мигрируют в полярную плазму яйца. У этих зародышей полярные клетки не образуются, а у получившихся взрослых особей нет первичных половых клеток, из которых развиваются гаметы. Другая мутация с материнским эффектом — *agametic* — вызывает отсутствие первичных половых клеток примерно у половины потомков, полученных от гомозиготных самок. В этом случае у потомков формируется нормальное число полярных клеток, но полярные гранулы разрушаются вскоре после оплодотворения (Engstrom et al., 1982). Опыты по трансплантации показали, что дефект заключается в самой полярной плазме, а не в яичнике. Таким образом, теперь получены очень четкие доказательства того, что полярные гранулы имеют прямое отношение к образованию половых клеток.

Эти полярные гранулы были выделены из зародышей дрозофилы (Waring et al., 1978); оказалось, что они содержат белок и РНК. Молекулярная масса этого белка (в гранулах, по-видимому, преобладает один белок) равна 95 000; он обладает основными свойствами и синтезируется заново в период оогенеза, так что полярные гранулы не наследуются непосредственно через цитоплазму яйца. РНК присутствует в полярных гранулах ооцита, но не обнаруживается после того, как сформировались полярные клетки (Mahowald, 1971a, b). Возможно, что эта РНК чрезвычайно важна для формирования половых клеток. Окада и Кобаяси (Okada, Kobayashi, 1987) инъецировали РНК из яиц и ранних дробящихся зародышей дрозофилы зародышам, у которых полярные клетки были убиты ультрафиолетом. Эти зародыши-хозяева формировали полярные клетки и развивались в мух, имевших половые клетки.

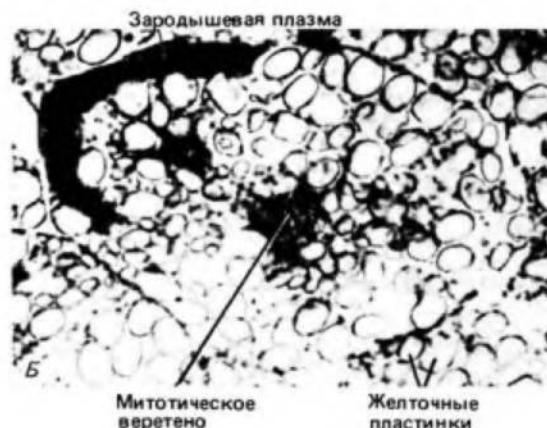
Полярные гранулы изменяются в процессе развития. До оплодотворения плотные гранулы, содержащие мембраны, группируются вокруг мито-

хондрией, а затем диспергируются, прежде чем ядра достигнут полюса. Впоследствии полярные клетки включают в себя эти гранулы. Когда полярные клетки мигрируют в половой валик, полярные гранулы деконденсируются на филаменты, называемые *nuage*. Этот материал скапливается около оболочки ядра. Такое поведение полярных гранул обнаружено у всех изученных представителей животного царства (Eddy, 1975) и, вероятно, имеет важное значение для гаметогенеза.

Детерминация половых клеток у амфибий

Цитоплазматическая локализация детерминантов половых клеток установлена также у зародышей позвоночных животных. Бунур (Bounoure, 1934) показал, что вегетативная область оплодотворенного яйца лягушки содержит материал, окрашивающийся так же, как полярная плазма у дрозофилы (рис. 7.27). Этот автор проследил судьбу кортикальной цитоплазмы до тех немногих клеток в презумптивной энтодерме, которые в норме будут мигрировать в половую складку. Блэклер (Blackler, 1962) получил убедительные данные о том, что эти клетки являются предшественниками первичных половых клеток. Он удалял определенную область энтодермы у зародыша лягушки на стадии нейрулы и пересаживал ее в такую же область другому зародышу лягушки, находящемуся на той же стадии развития (рис. 7.28). Зародышей-доноров было легко отличить от хозяев, так как их клетки содержали только одно ядрышко вместо обычных двух. Лягушки-хозяева относились к дикому типу (т.е. имели по два ядрышка в одном ядре). После операции из нейрул доноров развивались стерильные лягушки. Отсюда следовало, что зародыш на стадии нейрулы неспособен к регуляции дефекта и что удаленная область была выбрана правильно. Однако из нейрул-хозяев развивались фертильные особи. Более того, если этих лягушек спаривали с нормальными самцами, то потомство было смешанным — получались лягушки, в клетках которых содержалось по одному или по два ядрышка. Таким образом, некоторые из гамет хозяина происходили из энтодермальной области зародыша-донора. Если бы ни одна гамета не развивалась из ткани донора, то у 100% лягушек в клетках содержалось бы по два ядрышка. Если бы каждая половая клетка вела свое происхождение от тканей донора, то соотношение одно- и двуядрышковых особей в потомстве составляло бы 1:1, как это показано на рис. 7.28. В некоторых опытах именно последний результат и был получен.

Бунур и др. (Bounoure et al., 1939) показали, что если вегетативный полюс оплодотворенных яиц лягушки облучить ультрафиолетовым светом, то из



таких яиц развивались стерильные взрослые лягушки, хотя во всех других отношениях они были нормальными. В 1966 г. Л. Деннис Смит (Smith, 1966) продолжил эти исследования, облучая ультрафиолетом разные области зародыша лягушки. Он обнаружил, что облучение анимального полушария не влияет на нормальное развитие, тогда как облучение вегетативного полюса приводит к образованию головастиков, в половой складке которых не было видно крупных первичных половых клеток. Смит выявил значение этой области цитоплазмы путем инъекции цитоплазмы из разных областей нормальных зигот в вегетативную (презумптивную вентральную) область облученным зиготам. Если вводили цитоплазму из области анимального полюса, то эффекта не обнаруживалось и у головастиков, развившихся из таких яиц, отсутствовали половые клетки. Если же инъецировали цитоплазму из области вегетативного полюса, то у головастиков в половой складке были видны первичные половые клетки. Позже было показано (Züst, Dixon, 1977), что первичные половые клетки действительно до-

Рис. 7.27. Зародышевая плазма в зародышах лягушки. А. Зародышевая плазма (темные участки) вблизи вентрального (вегетативного) полюса только что оплодотворенного яйца. Б. Содержащая зародышевую плазму клетка из энтодермальной области бластулы лягушки; ядро клетки находится на стадии анафазы. Следует подчеркнуть, что зародышевая плазма попадает только в одну из двух богатых желтком дочерних клеток. В. Первичная половая клетка и соматические клетки вблизи дна бластоцеля у зародыша на стадии ранней гаструлы. (Фотографии с любезного разрешения А. Blackler.)

стигают половой складки у головастиков, зародышевая плазма которых была облучена на стадии 2 или 4 бластомеров. Однако в гонаде содержалось значительно меньше клеток, чем в норме, и по размерам они были не больше 1/10 величины нормальных первичных половых клеток. Их ядра были неправильной формы, и клетки достигали гонад значительно позже, чем их двойники из необлученных яиц. Итак, подобно полярной плазме у дрозофилы, цитоплазма вентральной области зиготы у лягушки содержит детерминанту, которая определяет образование половых клеток и их миграцию, чувствительна к облучению ультрафиолетом и может быть перенесена в другую область вместе с частью жидкой цитоплазмы.

Генетика цитоплазматических детерминантов у дрозофилы

В 1936 г. эмбриолог Джаст (Just, 1936) критиковал тех генетиков, которые полагали, что объяснить процессы развития можно, изучая мутации, влияющие на окраску глаза, число щетинок и форму крыла. Он говорил, что не интересуется развитием щетинок на спине мухи, а хочет знать, как у зародыша мухи образуется сама спина. Спустя 50 лет эмбриологи и генетики, наконец, ответили на этот вопрос.

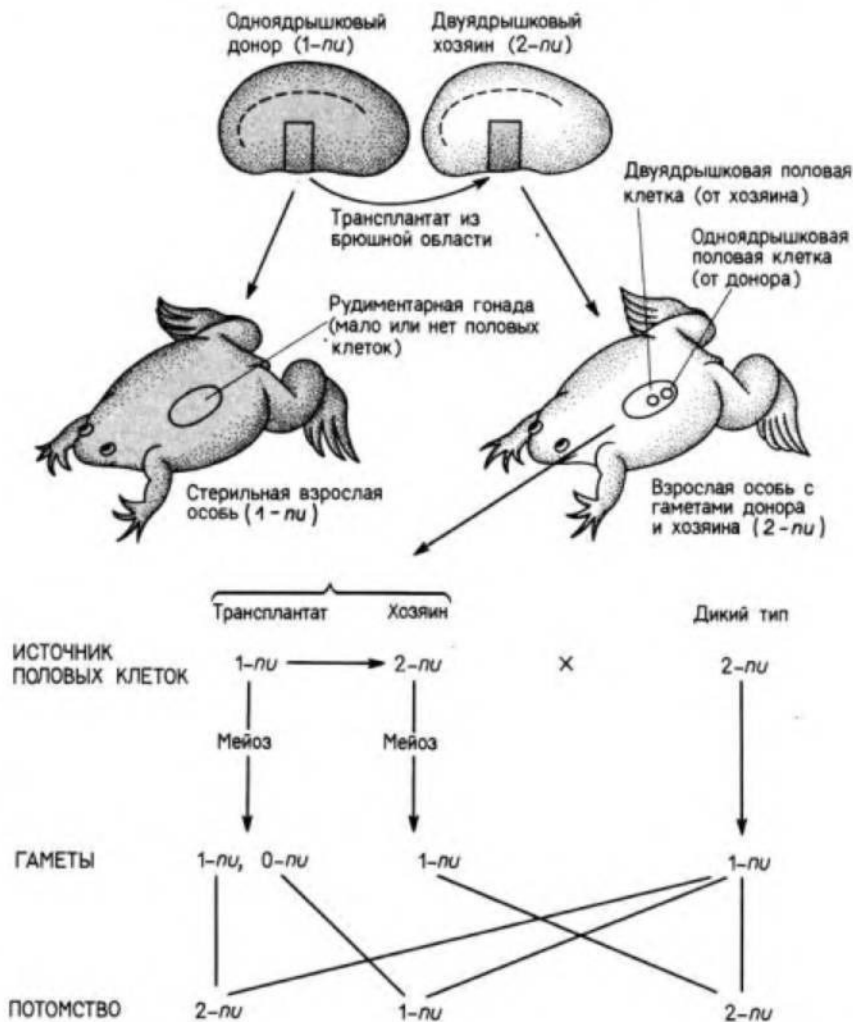


Рис. 7.28. Обнаружение первичных половых клеток в энтодерме нейрулы лягушки. Участок ткани из вентральной области зародыша-донора из линии лягушек, в клетках которых имеется только по одному ядрышку (1-*nu*), пересаживали в аналогичную область зародыша-хозяина из линии лягушек, клетки которых содержат по два ядрышка (2-*nu*). Взрослое животное, развивавшееся из зародыша-донора, оказывалось стерильным, тогда как зародыш-хозяин развивался в лягушку, у которой имелись гаметы двух типов – 1-*nu* и 2-*nu*. Этот факт был подтвержден в опытах по скрещиванию лягушки-хозяина с нормальной (двоядрышковой) особью; результаты такого скрещивания показаны в графической форме в нижней части рисунка. Некоторые из потомков имели только по одному ядрышку в клетках; это свидетельствовало о том, что они получили одно ядрышко от одного из родителей (двоядрышковой линии) и не получили ни одного ядрышка от другого родителя (лягушка двоядрышковой линии с некоторым количеством одноядрышковых половых клеток). (По Blackler, 1966.)

В настоящее время мы располагаем данными о существовании в яйцах двукрылых насекомых трех групп детерминантов. Одну группу составляют факторы, детерминирующие образование полярных и первичных половых клеток, которые уже обсуждались в этой главе. Вторая группа цитоплазматических детерминантов контролирует дорсовентральную полярность, разграничивающую спинную и брюшную области у личинки мухи. Третья группа детерминантов устанавливает переднезаднюю по-

лярность (голова-хвост) развивающегося насекомого.

Дорсовентральная полярность. Дорсовентральная полярность у дрозофилы определяется (специфицируется) по меньшей мере 11 продуктами деятельности генома матери, накапливающимися в ооците по мере его развития. Андерсон и Нюсслейн-Вольгард (Anderson, Nüsslein-Volhard, 1984) изолировали 10 генов с материнским эффектом, отсутствие каждого из которых связано с отсутствием вентральных

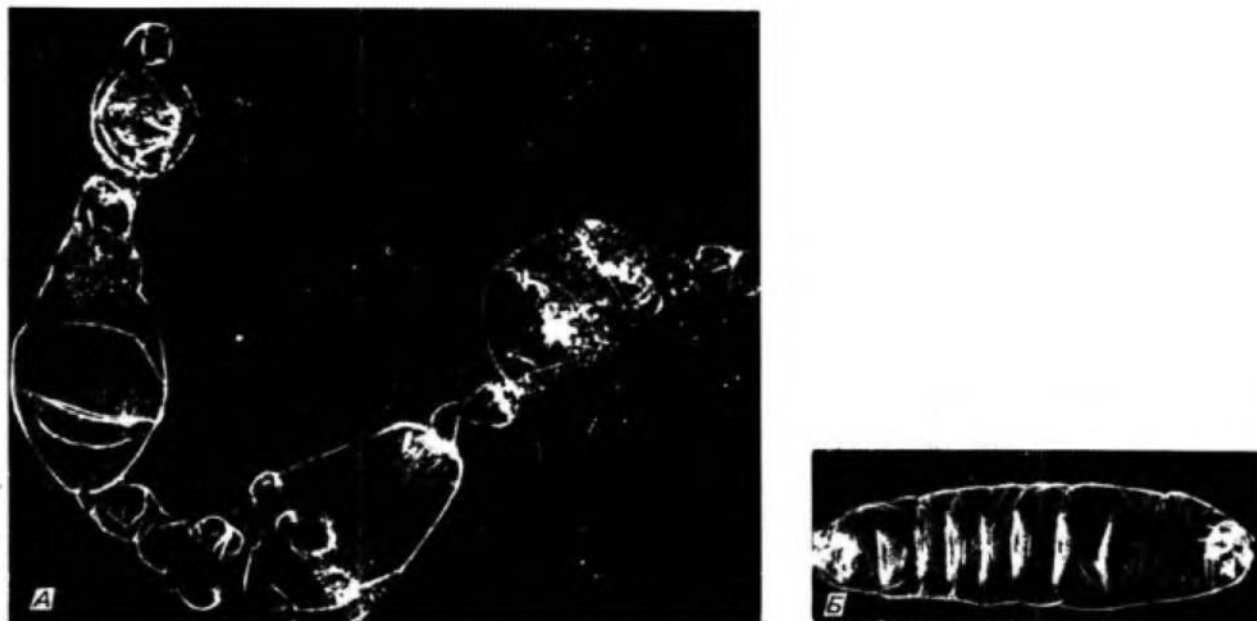


Рис. 7.29. Предотвращение развития дефектов у личинки путем инъекции мРНК из яиц дикого типа в яйца, предназначенные иметь фенотип *snake*. А. Деформированная личинка, состоящая исключительно из дорсальных клеток. Такие личинки развиваются из яиц самок, гомозиготных по аллелю *snake*. Б. Фенотип дикого типа у личинки, развившейся из яйца самки *snake*, в которое была инъектирована мРНК из яиц дикого типа. (Из Anderson, Nüsslein-Volhard, 1984; фотографии с любезного разрешения С. Nüsslein-Volhard.)

структур. В некоторых случаях материнским продуктом является, по-видимому, белок, тогда как в других случаях самка мухи снабжает яйцо специфической мРНК. Одна из мутаций, связанных с материнским эффектом, называется *snake*. Самки, гомозиготные по этой мутации, продуцируют яйца, которые развиваются в полностью дорсализованных зародышах. У них отсутствуют кутикула и структуры, типичные для брюшка личинки. Такие зародыши могут быть «исправлены» инъекцией небольшого количества цитоплазмы из яиц дикого типа. Показано, что активный компонент цитоплазмы яйца дикого типа представляет собой накопленную в оогенезе мРНК, поскольку если мРНК экстрагировали из яиц дикого типа и затем инъектировали мутантным зародышам на стадиях раннего дробления, то вентральные структуры и кутикула развивались нормально (рис. 7.29). Таким образом, здесь мы встречаемся с ситуацией, когда в материнском гене закодирована мРНК, необходимая для дорсовентральной спецификации. В отсутствие этого продукта все клетки развиваются в дорсальные структуры, но когда этой мРНК снабжают дефектных зародышей, их нормальное развитие восстанавливается.

Рецессивная мутация *Toll* имеет сходный дорсализованный фенотип, и инъекция мРНК из яиц дикого типа восстанавливает дорсовентральную

полярность яиц, отложенных матерями *Toll⁻/Toll⁻*. Но в отличие от случая *snake* в данной ситуации имеет значение место инъекции. В какую бы часть яйца ни инъектировали мРНК, эта часть становится вентральной областью «излеченного» зародыша (Anderson et al., 1985). Это позволяет предположить, что в яйцах *Toll⁻/Toll⁻* отсутствует дорсовентральная полярность (тогда как в случае мутации *snake* при инъекции мРНК дикого типа вентральная область занимает свое нормальное место). Поэтому представляется вероятным, что продукт дикого типа *Toll* участвует в установлении этой полярности и действует раньше продукта гена *snake* (рис. 7.30).

При клонировании аллеля дикого типа *snake* (DeLotto, Spierer, 1986) было обнаружено, что он кодирует аминокислотную последовательность, сходную с последовательностью протеаз трипсина и фактора свертывания крови. Такие ферменты часто принимают участие в активации неактивных предшественников посредством отщепления аминокислотной последовательности, подавляющей их активность. Этот факт поддерживает предположение Андерсона и Нюсслейн-Вольгард о том, что продукт гена *Toll* является неактивным белком, который активируется продуктами нормальных аллелей гена *snake* и других локусов.

По крайней мере один продукт гена, необходимый для установления и поддержания дорсовен-

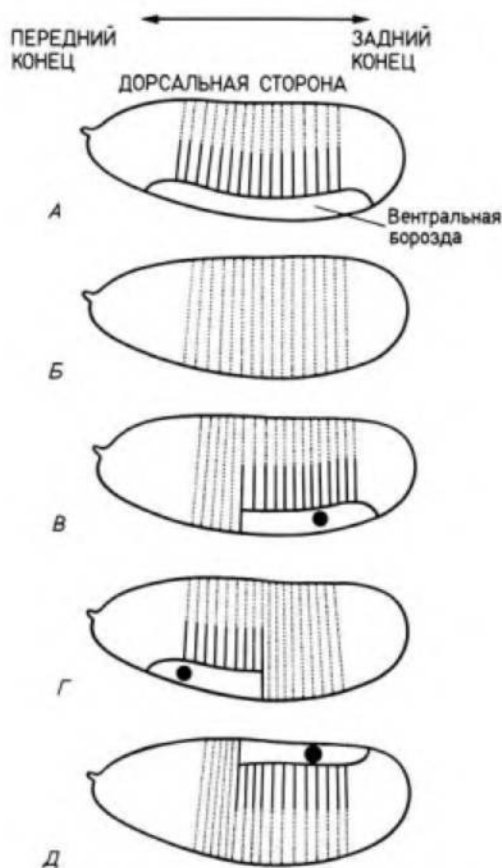


Рис. 7.30. Связь между местом инъекции мРНК и положением дорсовентральной оси у зародышей *Toll*⁻, получивших мРНК из яиц дикого типа. А. Личинка с нормальным положением дорсовентральной оси; у личинки имеются вентральная борозда и связанные с ней структуры. Б. Клетки зародыша *Toll*⁻ дифференцируются с образованием только дорсального эпидермиса. В–Д. Локализация инъекционной цитоплазмы дикого типа (обозначена черным пятном) определяет положение дорсовентральной оси. (Обратите внимание, однако, что эти структуры никогда не распространяются по всей переднезадней оси.) (По Anderson et al., 1985.)

тральной полярности, должен быть белком. Инъекция цитоплазмы яйца дикого типа корректирует (исправляет) в яйцах дефект, обусловленный материнскими генами, но изолированная из нее мРНК не восстанавливает дорсовентральную полярность.

Что же контролируют эти продукты генов с материнским эффектом? Плагают, что они участвуют в образовании репрессора, который подавляет активацию единичного гена в геноме дрозофилы. Этот ген *zerknüllt* (*zen*) обычно экспрессируется только в дорсальных структурах, составляющих 40% зародыша, и не бывает активным в вентральных областях. У тех 10 мутантов с материнским эффектом, которые характеризуются дорсализацией зародыша,

ген *zen* экспрессируется и в дорсальных, и в вентральных областях зародыша. У одного мутанта с материнским эффектом (*cactus*), характеризующегося вентрализацией зародыша, ген *zen* репрессируется во всем зародыше (рис. 7.31; Rushlow et al., 1987). Возможно, что нормальные аллели десяти мутантов с материнским эффектом вентрализации включены в процесс образования ингибитора гена *zen*, тогда как нормальный аллель гена *cactus* продуцирует репрессор этого ингибитора, способствуя активации гена *zen* в этой части зародыша.

ПЕРЕДНЕЗАДНЯЯ ПОЛЯРНОСТЬ. Другая группа мутаций с материнским эффектом ответственна за спецификацию переднезадней полярности у личинок насекомых. Один такой аллель носит название *bicoid* (*bcd*). У зародышей, происходящих от самок, гомозиготных по гену *bicoid*, отсутствуют голова и грудные сегменты. Цитоплазма яиц дикого типа (примерно 3% всего объема яйца) может излечить этих дефектных зародышей, но только при том условии, что цитоплазма взята из передней четверти яйца. Более того, место, в которое инъецировали эту цитоплазму, станет затем передним участком тела. Фенотип мутанта *bicoid* можно получить (фенокопировать), проколов передний конец раннего зародыша дикого типа и позволив вытечь около 5% цитоплазмы (Frohnhofer, Nüsslein-Volhard, 1986).

Аналогом мутации *bicoid* в заднем конце, по-видимому, является мутация *oskar*. У зародышей, развившихся из яиц, отложенных гомозиготными самками *oskar*, не образуются структуры брюшка или полярные клетки. Результаты опытов по трансплантации (Lehmann, Nüsslein-Volhard, 1986), сходных с теми, которые проведены на мутантах *bicoid*, показали, что детерминант для *oskar* находится только в заднем конце яйца дрозофилы дикого типа. Если цитоплазму, взятую из заднего конца зародыша, инъецировать в переднюю область зародыша дикого типа, то формируется вторая задняя область.

Мутации с материнским эффектом *caudal* (*cad*) и *bicaudal* (*bic*), по-видимому, отвечают на сигналы переднезадней полярности, даваемые мутациями *oskar* и *bicoid*. У зародышей, имеющих фенотип *caudal*, отсутствуют задние абдоминальные структуры, тогда как зародыши *bicaudal* имеют фенотип «двойного брюшка», выражающийся в том, что два задних зеркально отраженных отдела соединяются по средней линии (рис. 7.32). Таким образом, у зародышей *bicaudal* большая часть передних сегментов утрачена и замещена дубликатами задних сегментов. У дикого типа *caudal* мРНК в зародыше на стадии синцитиальной бластодермы распределена по заднепереднему градиенту концентрации. Она транслируется в ядерный белок со сходным градиентом концентрации (рис. 7.33, А). По мере цел-

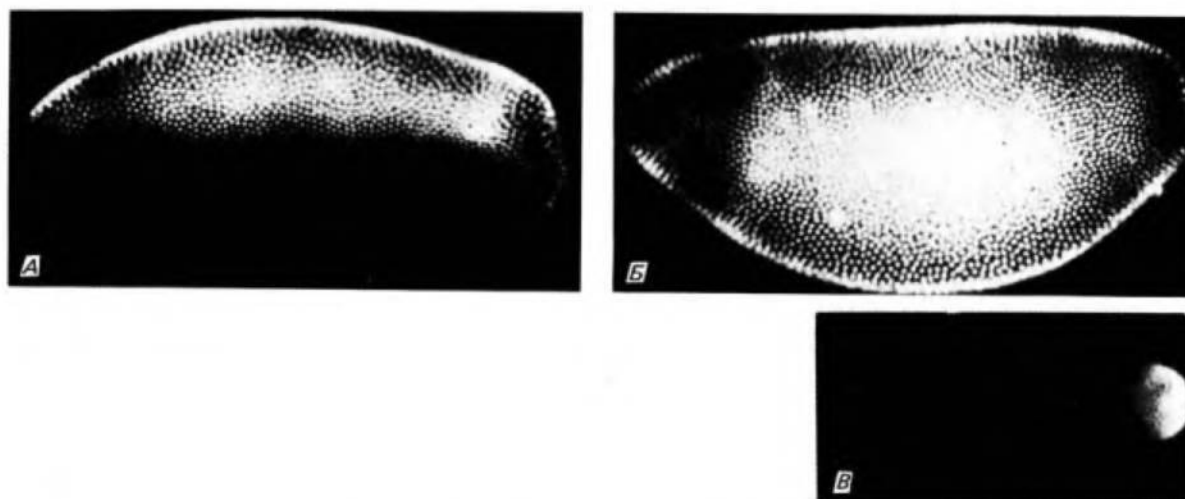


Рис. 7.31. Экспрессия гена *zen*. А. Экспрессия нормального аллеля *zen*, обнаруживаемая методом гибридизации *in situ* с одноцепочечной радиоактивной *zen*-ДНК на препарате среза через зародыш дикого типа и последующим выявлением радиоактивной метки с использованием фотографической эмульсии. Темные пятна представляют области, в которых радиоактивность ДНК, связанной с мРНК, восстанавливает зерна серебра в фотографической эмульсии. *Zen* мРНК обнаруживается в дорсальной области зародыша дикого типа. Б. Экспрессия гена *zen* во всем зародыше у дорсализованного мутанта. В. Отсутствие экспрессии гена *zen* у вентрализованного мутанта *cactus*. (Из Rushlow et al., 1987; фотографии с любезного разрешения M. Levine.)

поляризации бластомеры градиент поляризуется, т.е. белок обнаруживается в виде единичного кольца шириной в 3–4 клетки и в полярных клетках (рис. 7.33, Б). Следовательно, характер распределения белка в зародыше меняется от градиентного до локализованного в определенной области. Однако эффект мутации *bicaudal* предшествует действию гена *caudal*. При окрашивании на присутствие белка *caudal* в зародышах *bicaudal* обнаруживаются два

феномена. Во-первых, отсутствует градиентное распределение этого белка в синцитиальной бластомере (рис. 7.33, В), и, во-вторых, локализация белка *caudal* происходит в двух областях – вблизи переднего полюса и вблизи заднего полюса (рис. 7.33, Г). По-видимому, вещество *bicaudal* ответственно за считывание информации о передне-задней полярности и необходимо для правильного размещения продуктов гена *caudal*. Продукты этого

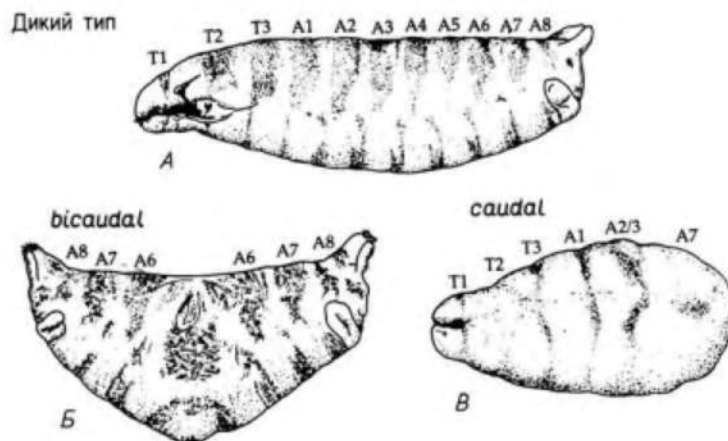


Рис. 7.32. Мутанты с нарушением переднезадней полярности. А. Кутикула личинки дикого типа; видны голова, три грудных сегмента (Т1–Т3) и 8 брюшных сегментов (А1–А8). Б. Симметричное двойное брюшко, характерное для зародыша, происходящего от самки, гомозиготной по мутации *bicaudal*. В. Редуцированное брюшко, характерное для зародышей, продуцируемых самками, гомозиготными по мутации *caudal*. (По Gergen et al., 1986; Macdonald, Struhl, 1986.)

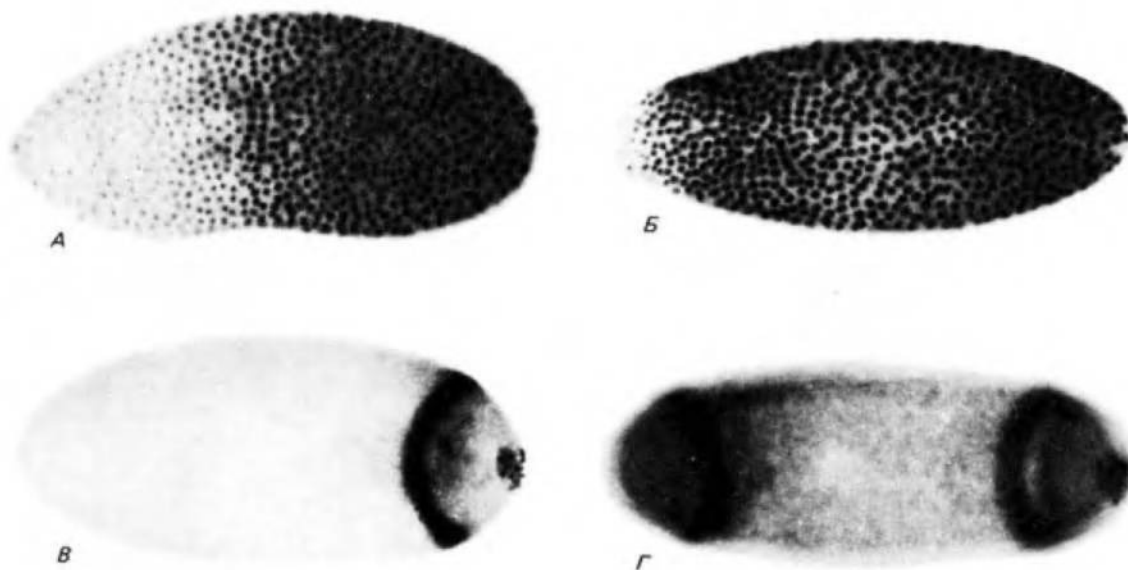


Рис. 7.33. Экспрессия нормального аллеля белка *caudal* в зародышах дрозофилы дикого типа и *bicaudal*. Зародышей фиксировали и окрашивали с помощью иммунологической методики, используя антитела к белку *caudal*. А. Виден градиент белка *caudal* в ядрах синцитиальной бластодермы зародыша дикого типа. Б. Градиент белка *caudal* дикого типа, экспрессированного в ядрах синцитиальной бластодермы зародыша *bicaudal*, отсутствует. В. Стадия клеточной бластодермы зародыша дикого типа. Видно заднее кольцо белка *caudal*. Г. В клеточной бластодерме мутанта *bicaudal* видны два кольца белка *caudal* (по одному на каждом конце зародыша). Каждый конец становится задней областью. (Из Macdonald, Struhl, 1986.)

гена, по всей вероятности, необходимы для активации генов, специфичных для задних сегментов (Macdonald, Struhl, 1986; Mlodzik, Gehring, 1987).

Сходные мутации были обнаружены у других видов мух (таких, как *Smittia*), а фенотипы этих мутантов могут быть получены облучением передней области яйца лазерным микроручом или микроинъекцией рибонуклеазы в переднюю область яйца (рис. 7.34; Kandler-Singer, Kalthoff, 1976). Такие облученные яйца можно «излечивать» микроинъекцией мРНК из зародышей дикого типа (Kalthoff, Elbetiehn, 1986).

Спецификация дорсовентральной и переднезадней полярности осуществляется двумя действующими независимо одна от другой группами детерминантов. Эти морфогенетические детерминанты представляют собой мРНК и белки, запасенные в ооците, а установление и поддержание каждой из осей зародыша осуществляются в результате взаимодействия этих факторов в цитоплазме яйца. Эти факторы распределяются по специфическим клеткам и влияют на транскрипцию генов в их ядрах. Процессы, благодаря которым разные сегменты приобретают свою специфику (например, то, что на грудных сегментах образуются ноги, а на брюш-

ных – нет) в соответствии с локализацией их клеток по этим осям, будут подробно рассмотрены в гл. 18. Изучение генетики формирования признаков у дрозофилы может стать «Золотым копьем» генетики развития. В течение десятилетий существовали два больших пробела, препятствующие попыткам объединить генетику и развитие. Первый – отсутствие



Рис. 7.34. Нормальный и облученный зародыши галлицы *Smittia*. У нормального зародыша (вверху) видны голова слева и брюшные сегменты справа. У облученного зародыша нет области головы, а на обоих концах имеются только брюшные сегменты. (Из Kalthoff, 1969; фотография с любезного разрешения К. Kalthoff.)

знаний о молекулах, которые участвуют в спецификации первичных эмбриональных осей. Каким образом задняя часть зародыша становится отличной от его передней части? Второй пробел в наших знаниях касается взаимодействия цитоплазматических детерминантов с ядрами клеток, содержащих эти детерминанты. Гены, ответственные за эти процессы, теперь известны, а некоторые из генных продуктов идентифицированы. В течение короткого времени мы сумеем объяснить, каким образом цитоплазматические детерминанты определяют судьбу клеток зародыша.

РЕЗЮМЕ

В настоящее время мы располагаем данными о том, что у некоторых организмов судьба любой клетки определяется той частью цитоплазмы, которую она приобретает в процессе дробления. Такая клетка дифференцируется независимо от других клеток, а организмы, использующие этот механизм, имеют тенденцию идти по пути мозаичного, или детерминированного, развития. Этот тип развития характерен для зародышей моллюсков, оболочников и нематод. Локализация морфогенов в цитоплазме яйца, их перераспределение в процессе развития яйца и оплодотворения, а также характер дробления имеют важное значение для детерминации судьбы каждой клетки. Любое из этих событий является функцией яйца. Развитие этих организмов в основном протекает по мозаичному типу, однако у них обнаруживаются и некоторые детерминирующие взаимодействия. У оболочников нервная система и некоторые из мышц формируются в результате индукционных взаимодействий между бластомерами; таким же способом образуются некоторые органы у улиток и нематод. В следующей главе мы рассмотрим развитие организмов, у которых индукционные взаимодействия составляют основной механизм детерминации судьбы клеток.

ЛИТЕРАТУРА

- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D. (1983). *Molecular Biology of the Cell*. Garland, New York.
- Anderson K., Bokla L., Nüsslein-Volhard C. (1985). Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: The induction of polarity by the *Toll* gene product. *Cell* **42**, 791–798.
- Anderson K. V., Nüsslein-Volhard C. (1984). Information for the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo is stored as maternal mRNA. *Nature* **311**, 223–227.
- Atkinson J. W. (1987). An atlas of light micrographs of normal and lobeless larvae of the marine gastropod *Ilyanassa obsoleta*. *Int. J. Invert. Reprod. Devel.* **9**, 169–178.
- Blackler A. W. (1962). Transfer of primordial germ cells between two subspecies of *Xenopus laevis*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **10**, 641–651.
- Blackler A. W. (1966). The role of a "germinal plasm" in the formation of primordial germ cells in *Rana pipiens*. *Dev. Biol.* **14**, 330–347.
- Bonnet C. (1764). *Contemplation de la Nature*. Marc-Michel Ray, Amsterdam.
- Bounoure L. (1934). Recherches sur la lignée germinale chez la grenouille rousse aux premiers stades du développement. *Ann. Sci. Natl.* 10e ser. **17**, 67–248.
- Bounoure L. (1939). L'origine des Cellules Reproductives et le Probleme de la Lignée Germinale. Gauthier-Villars, Paris.
- Boveri T. (1910). Über die Teilung centrifugierter Eier von *Ascaris megalocephala*. *Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org.* **30**, 101–125.
- Brandhorst B. P., Newrock K. M. (1981). Post-transcriptional regulation of protein synthesis in *Ilyanassa* embryos and isolated polar lobes. *Dev. Biol.* **83**, 250–254.
- Brenner S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**, 71–94.
- Brenner S. (1979). Cited in H. F. Judson (1979), *The Eight Day of Creation*. Simon and Schuster, New York, p. 219.
- Cassirer E. (1950). Developmental mechanics and the problem of cause in biology. In: E. Cassirer (ed.), *The Problem of Knowledge*. Yale University Press, New Haven.
- Cervera M., Dreyfuss G., Penman S. (1981). Messenger RNA is translated when associated with the cytoskeletal framework in normal and VSV-infected HeLa cells. *Cell* **23**, 113–120.
- Chabry L. M. (1887). Contribution a l'embryologie normale tératologique des ascidies simples. *J. Anat. Phys. Norm. Pathol.* **23**, 167–321.
- Churchill F. B. (1973). Chabry, Roux, and the experimental method in nineteenth century embryology. In: R. N. Giere and R. S. Westfall (eds.), *Foundations of Scientific Method: The Nineteenth Century*. Indiana University Press, Bloomington, pp. 161–205.
- Clement A. C. (1962). Development of *Ilyanassa* following removal of the D macromere at successive cleavage stages. *J. Exp. Zool.* **149**, 193–215.
- Clement A. C. (1968). Development of the vegetal half of the *Ilyanassa* egg after removal of most of the yolk by centrifugal force, compared with the development of animal halves of similar visible composition. *Dev. Biol.* **17**, 165–186.
- Clement A. C. (1986). The embryonic value of the micromeres in *Ilyanassa obsoleta*, as determined by deletion experiments. III. The third quartet cells and the mesentoblast cell, 4d. *Int. J. Invert. Reprod. Dev.* **9**, 155–168.
- Collier J. R. (1983). The biochemistry of molluscan development. In: N. H. Verdonk, J. A. M. van den Biggelaar and A. S. Tompa (eds.), *The Mollusca*, Vol. 3. Academic, New York, pp. 215–252.
- Collier J. R. (1984). Protein synthesis in normal and lobeless gastrulae of *Ilyanassa obsoleta*. *Biol. Bull.* **167**, 371–377.
- Conklin E. G. (1905a). The organization and cell lineage of the ascidian egg. *J. Acad. Nat. Sci. Phila.* **13**, 1–119.
- Conklin E. G. (1905b). Organ-forming substances in the eggs of ascidians. *Biol. Bull.* **8**, 205–230.
- Conklin E. G. (1905c). Mosaic development in ascidian eggs. *J. Exp. Zool.* **2**, 145–223.
- Craig M. M., Morrill J. B. (1986). Cellular arrangements and surface topology during early development in embryos of *Ilyanassa obsoleta*. *Int. J. Invert. Reprod. Dev.* **9**, 209–228.
- Crowther R. J., Whittaker J. R. (1984). Differentiation of histotypic ultrastructural features in cells of cleavage-arrested early ascidian embryos. *Wilhelm Roux Arch. Dev. Biol.* **194**, 87–98.
- Darrest C. (1877). *Recherches sur la Production Artificielle des Monstruosités ou Essais de Teratogenie Experimentale*. Reinwald, Paris.
- DeLotto R., Spierer P. (1986). A gene required for the specification of dorsal-ventral pattern in *Drosophila* appears to encode a serine protease. *Nature* **323**, 688–692.

- Deno T., Nishida H., Sato N. (1984). Autonomous muscle cell differentiation in partial ascidian embryos according to the newly verified cell lineages. *Dev. Biol.* **104**, 322–328.
- Eddy E.M. (1975). Germ plasm and the differentiation of the germ line. *Int. Rev. Cytol.* **43**, 229–280.
- Edgar L.G., McGhee J.D. (1986). Embryonic expression of a gut-specific esterase in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **114**, 109–118.
- Engstrom L., Caulton J.H., Underwood E.M., Mahowald A.P. (1982). Developmental lesions in the agametic mutant of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* **91**, 163–170.
- Fischer J.-L., Smith J. (1984). French embryology and the "mechanics of development" from 1887 to 1910: L. Chabry, Y. Delage and E. Bataillon. *Hist. Phil. Life Sci.* **6**, 25–39.
- Frohnhofer H.G., Nüsslein-Volhard C. (1986). Organization of anterior pattern in the *Drosophila* embryo by the maternal gene *bicoid*. *Nature* **324**, 120–125.
- Geigy R. (1931). Action de l'ultra-violet sur le pôle germinale dans l'oeuf de *Drosophila melanogaster* (castration et mutabilité). *Rev. Suisse Zool.* **38**, 187–288.
- Gergen J.P., Coulter D., Wieschaus E. (1986). Segmental pattern and blastoderm cell identities. In: J.G. Gall (ed.), *Gametogenesis and the Early Embryo*. Alan R. Liss, New York, pp. 195–220.
- Geyer-Duszynska I. (1959). Experimental research on chromosome diminution in Cecidomyiidae (Diptera). *J. Exp. Zool.* **141**, 381–441.
- Gould S.J. (1977). *Ontogeny and Phylogeny*. Belknap Press, Cambridge, MA.
- Guerrier P., van den Biggelaar J.A.M., van Dongen C.A.M., Verdonk N.H. (1978). Significance of the polar lobe for the determination of dorsoventral polarity in *Dentalium vulgare* (da Costa). *Dev. Biol.* **63**, 233–242.
- Haller A. von (1758). Sur la Formation du Coeur dans le Poulet. *Mem. Il. M.M. Bousquet and Co., Lausanne*.
- Hegner R.W. (1911). Experiments with chrysomelid beetles. III. The effects of killing parts of the eggs of *Leptinotarsa decemlineata*. *Biol. Bull.* **20**, 237–251.
- Henry J.J., Martindale M.Q. (1987). The organizing role of the D quadrant as revealed through the phenomenon of twinning in the polychaete *Chaetopterus variopedatus*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **196**, 449–510.
- Hill D.P., Strome S. (1987). An analysis of the role of microfilaments in the establishment and maintenance of asymmetry in *Caenorhabditis elegans* zygotes. *Dev. Biol.* **125**, 75–84.
- Ikenishi K., Kotani M. (1979). Ultraviolet effects on presumptive primordial germ cells (pPGCs) in *Xenopus laevis* after the cleavage stage. *Dev. Biol.* **69**, 237–246.
- Illmensee K. (1968). Transplantation of embryonic nuclei into unfertilized eggs of *Drosophila melanogaster*. *Nature* **219**, 1268–1269.
- Illmensee K. (1972). Developmental potencies of nuclei from cleavage, preblastoderm, and syncytial blastoderm transplanted into unfertilized eggs of *Drosophila melanogaster*. *Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org.* **170**, 267–298.
- Illmensee K., Mahowald A.P. (1974). Transplantation of posterior polar plasm in *Drosophila*. Induction of germ cells at the anterior pole of the egg. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**, 1016–1020.
- Illmensee K., Mahowald A.P., Loomis M.R. (1976). The ontogeny of germ plasm during oogenesis in *Drosophila*. *Dev. Biol.* **49**, 40–65.
- Jeffery W.R. (1984). Spatial distribution of messenger RNA in the cytoskeletal framework of ascidian eggs. *Dev. Biol.* **103**, 482–492.
- Jeffery W.R. (1985). Identification of proteins and mRNAs in isolated yellow crescents of ascidian eggs. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **89**, 275–287.
- Jeffery W.R., Bates W.R., Beach R.L., Tomlinson C.R. (1986). Is maternal mRNA a determinant of tissue-specific proteins in ascidian embryos? *J. Embryol. Exp. Morphol.* **97** [Suppl.], 1–14.
- Jeffery W.R., Meier S. (1983). A yellow crescent cytoskeletal domain in ascidian eggs and its role in early development. *Dev. Biol.* **96**, 125–143.
- Just E.E. (1936). Quoted in Harrison R.G. (1937). *Embryology and its relations*. Science **85**, 369–374.
- Kalthoff K. (1969). Der Einfluss verschiedener Versuchsparameter auf die Häufigkeit der Missbildung "Doppelabdomen" in UV-bestrahlten Eiern von *Smittia* sp. (Diptera, Chironomidae). *Zool. Anz. Suppl.* **33**, 59–65.
- Kalthoff K., Elbetieha A. (1986). Transplantation of localized anterior determinants in *Chironomus* eggs by microinjection. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **97** [Suppl.], 181–196.
- Kandler-Singer I., Kalthoff K. (1976). RNase sensitivity of an anterior morphogenetic determinant in an insect egg (*Smittia* sp.; Chironomidae, Diptera). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 3739–3743.
- Kimble J. (1981). Lineage alterations after ablation of cells on the somatic gonad of *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **87**, 286–300.
- Kimble J., Hirsch D. (1979). The postembryonic cell lineages of the hermaphrodite and male gonads in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **70**, 396–417.
- Kölreuter J.G. (1761–1766). Vorläufige Nachricht von einigen das Geschlecht der Pflanzen betreffenden Versuchen und Beobachtungen, nebst Fortsetzungen 1, 2 und 3. Leipzig.
- Kunz W., Trepte H.H., Bier K. (1970). On the function of the germ line chromosomes in the oogenesis of *Wachtelia persiariae* (Cecidomyiidae). *Chromosoma* **30**, 180–192.
- Lauffer J.S., Buzzicalupo P., Wood W.B. (1980). Segregation of developmental potential in early embryos of *Caenorhabditis elegans*. *Cell* **19**, 569–577.
- Lehmann R., Nüsslein-Volhard C. (1986). Abdominal segmentation, pole cell formation, and embryonic polarity require the localized activity of *oskar*, a maternal gene in *Drosophila*. *Cell* **47**, 141–152.
- Lenoir T. (1980). Kant, Blumenbach, and vital materialism in German biology. *Isis* **71**, 77–108.
- Macdonald P.M., Struhl G. (1986). A molecular gradient in early *Drosophila* embryos and its role in specifying body pattern. *Nature* **324**, 537–545.
- Mahowald A.P. (1971a). Polar granules of *Drosophila*. III. The continuity of polar granules during the life cycle of *Drosophila*. *J. Exp. Zool.* **176**, 329–343.
- Mahowald A.P. (1971b). Polar granules of *Drosophila*. IV. Cytochemical studies showing loss of RNA from polar granules during early stages of embryogenesis. *J. Exp. Zool.* **176**, 329–343.
- Mahowald A.P., Caulton J.H., Gehring W.J. (1979). Ultrastructural studies of oocytes and embryos derived from female flies carrying the *grandchildless* mutation of *Drosophila subobscura*. *Dev. Biol.* **69**, 118–132.
- Meedel T.H., Crowther R.J., Whittaker J.R. (1987). Determinative properties of muscle lineages in ascidian embryos. *Development* **100**, 245–260.
- Meedel T.H., Whittaker J.R. (1983). Development of transcriptionally active mRNA for larval muscle acetylcholinesterase during ascidian embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 4761–4765.
- Meedel T.H., Whittaker J.R. (1984). Lineage segregation and developmental autonomy in expression of functional muscle acetylcholinesterase in the ascidian embryo. *Dev. Biol.* **105**, 479–487.
- Melton D. (1987). Translocation of a localized maternal mRNA to the vegetal pole of *Xenopus* oocytes. *Nature* **328**, 80–82.
- Mlodzik M., Gehring W.J. (1987). Expression of the *caudal* gene in the germ line of *Drosophila*: Formation of an RNA and

- protein gradient during early embryogenesis. *Cell* **48**, 465–478.
- Moon R. T., Nicosia R. F., Olsen C., Hille M., Jeffery W. R. (1983). The cytoskeletal framework of sea urchin eggs and embryos: Developmental changes in the association of messenger RNA. *Dev. Biol.* **95**, 447–458.
- Morgan T. H. (1927). *Experimental Embryology*. Columbia University Press, New York.
- Newrock K. M., Raff R. A. (1975). Polar lobe specific regulation of translation in embryos of *Illyanassa obsoleta*. *Dev. Biol.* **42**, 242–261.
- Nishida H. (1987). Cell lineage analysis in ascidian embryos by intracellular injection of a tracer enzyme. III. Up to the tissue restricted stage. *Dev. Biol.* **121**, 526–541.
- Nishikata T., Mita-Miyazawa I., Deno T., Satoh N. (1987). Monoclonal antibodies against components of the myoplasm of the ascidian *Ciona intestinalis* partially block the development of muscle-specific acetylcholinesterase. *Development* **100**, 577–586.
- Okada M., Kleinman I. A., Schneiderman H. A. (1974). Restoration of fertility in sterilized *Drosophila* eggs by transplantation of polar cytoplasm. *Dev. Biol.* **37**, 43–54.
- Okada M., Kobayashi S. (1987). Maternal messenger RNA as a determinant of pole cell formation in *Drosophila* embryos. *Dev. Growth Diff.* **29**, 185–192.
- Ortolani G. (1959). Ricerche sulla induzione del sistema nervoso nelle larve delle Ascidie. *Boll. Zool.* **26**, 341–348.
- Reverberi G., Minganti A. (1946). Fenomeni di evocazione nello sviluppo dell'uovo di Ascidie. Risultati dell'indagine sperimentale sull'uovo di *Ascidella aspersa* e di *Ascidia malaca* allo stadio di 8 blastomeri. *Pubbl. Staz. Zool. Napoli* **20**, 199–252. (Quoted in Reverberi, 1971, p. 537).
- Roe S. (1981). Matter, Life, and Generation: Eighteenth-Century Embryology and the Halle–Wolff Debate. Cambridge University Press, Cambridge.
- Rushlow C., Frasch M., Doyle H., Levine M. (1987). Maternal regulation of *zerknüllt*: A homeobox gene controlling differentiation of dorsal tissues in *Drosophila*. *Nature* **330**, 583–586.
- Satoh N. (1979). On the "clock" mechanism determining the time of tissue-specific development during ascidian embryogenesis. I. Acetylcholinesterase development in cleavage-arrested embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **54**, 131–139.
- Schubiger G., Wood W. J. (1977). Determination during early embryogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Am. Zool.* **17**, 565–576.
- Smith L. D. (1966). The role of a "germinal plasm" in the formation of primordial germ cells in *Rana pipiens*. *Dev. Biol.* **14**, 330–347.
- Strome S., Wood W. B. (1983). Generation of asymmetry and segregation of germ-like granules in early *Caenorhabditis elegans* embryos. *Cell* **35**, 15–25.
- Sulston J., Horvitz H. R. (1977). Postembryonic cell lineages of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **56**, 110–156.
- Sulston J. E., Schierenberg J., White J., Thomson N. (1983). The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **100**, 64–119.
- Tobler H., Smith K. D., Ursprung H. (1972). Molecular aspects of chromatin elimination in *Ascaris lumbricoides*. *Dev. Biol.* **27**, 190–203.
- Tung T. C., Wu S. C., Yel Y. F., Li K. S., Hsu M. C. (1977). Cell differentiation in ascidians studied by nuclear transplantation. *Scientia Sinica* **20**, 222–233.
- Verdonk N. H., Cather J. N. (1983). Morphogenic determination and differentiation. In: N. H. Verdonk, J. A. M. van der Biggelaar and A. S. Tompa (eds.), *The Mollusca*. Academic, New York, pp. 215–252.
- Waddington C. H. (1966). *Principles of Development and Differentiation*. Macmillan, New York.
- Waring G. L., Allis C. D., Mahowald A. P. (1978). Isolation of polar granules and the identification of polar granule-specific protein. *Dev. Biol.* **66**, 197–206.
- Weeks D. L., Rebagliati M. R., Harvey R. P., Melton D. A. (1985). Localized maternal mRNAs in *Xenopus laevis* eggs. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **50**, 21–30.
- Whittaker J. R. (1973a). Segregation during ascidian embryogenesis of egg cytoplasmic information for tissue-specific enzyme development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 2096–2100.
- Whittaker J. R. (1973b). Evidence for the localization of an RNA template for endodermal alkaline phosphatase in an ascidian egg. *Biol. Bull.* **145**, 459–460.
- Whittaker J. R. (1977). Segregation during cleavage of a factor determining endodermal alkaline phosphatase development in ascidian embryos. *J. Exp. Zool.* **202**, 139–153.
- Whittaker J. R. (1979). Cytoplasmic determinants of tissue differentiation in the ascidian egg. In: S. Subtelny and I. R. Konigsberg (eds.), *Determinants of Spatial Organization*. Academic, New York, pp. 29–51.
- Whittaker J. R. (1982). Muscle cell lineage can change the developmental expression in epidermal lineage cells of ascidian embryos. *Dev. Biol.* **93**, 463–470.
- Whittaker J. R. (1987). Cell lineages and determinants of cell fate in development. *Am. Zool.* **27**, 607–622.
- Whittaker J. R., Ortolani G., Farinella-Ferruzza N. (1977). Autonomy of acetylcholinesterase differentiation in muscle lineage cells in ascidian embryos. *Dev. Biol.* **55**, 196–200.
- Wilson E. B. (1904). Experimental studies on germinal localization. I. The germ regions in the egg of *Dentalium*. II. Experiments on the cleavage-mosaic in *Patella* and *Dentalium*. *J. Exp. Zool.* **1**, 1–72.
- Wolff K. F. (1767). De formatione intestinorum praecipue. *Novi Commentarii Academiae Scientiarum Imperialis Petropolitanae*.
- Zalokar M. (1971). Transplantation of nuclei in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**, 1539–1541.
- Zumbe A., Stahl C., Trachsel H. (1982). Association of a Mr 50,000 cap-binding protein with the cytoskeleton in baby hamster kidney cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 2927–2931.
- Züst B., Dixon K. E. (1977). Events in the germ cell lineage after entry of the primordial germ cells into the genital ridges in normal and UV-irradiated *Xenopus laevis*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **41**, 33–46.

Глава 8

Прогрессивная детерминация

Том теперь – великий муж науки... и знает обо всем, кроме того, почему из куриного яйца не вылупляется крокодил.

ЧАРЛЗ КИНГСЛИ (1863)

Мы стоим на ногах и ходим с помощью ног, но если бы эти части нашего тела развивались в другой области зародыша, то они не без успеха могли бы быть использованы нами для того, чтобы мыслить.

ГАНС ШПЕМАН (1943)

Введение

Из предыдущей главы мы узнали, что детерминацию обуславливает распределение специфических цитоплазматических веществ между бластомерами в период дробления. Мы узнали также, что действием цитоплазматических детерминантов невозможно объяснить все детерминационные события в эмбриогенезе. В некоторых случаях для формирования определенного типа ткани необходимо взаимодействие между двумя бластомерами. Из этой главы мы узнаем о том, что способ детерминации посредством взаимодействий между частями зародыша имеет чрезвычайно важное значение, особенно для развития вторичноротых, таких, как морские ежи и позвоночные. Открытие этого типа детерминации уходит своими корнями в недостатки мозаичных теорий развития, сформулированных в Германии в конце прошлого столетия.

Август Вейсман: теория зародышевой плазмы

В 1883 г. Август Вейсман начал разрабатывать теорию, которая должна была интегрировать такие различные биологические явления, как наследственность, развитие, регенерация, половое размножение и эволюция путем естественного отбора. Вейсман был блестящим химиком и врачом, обратившим свое внимание на проблемы развития и метаморфоза. В 1863 г., когда тяжелая болезнь глаз лишила

его возможности пользоваться микроскопом, он стал задумываться над тем, каким образом из половых клеток возникают дифференцированные потомки. В поисках ответа на этот вопрос Вейсман освободился от прямых объяснений дарвиновского типа (т.е. от использования эмбриологии как аргумента для обоснования эволюционной родословной) и поставил эмбриологию на путь физиологических исследований, отдававших предпочтение экспериментальному вмешательству в развитие перед описательными наблюдениями.

Цитологические исследования семидесятых годов прошлого века дали Вейсману новую важную информацию, касающуюся полового размножения. Герман Фоль и Ричард Гертвиг независимо друг от друга наблюдали соединение яйца и спермия и их пронуклеусов. Такие исследователи, как ван Бенеден и Штрасбургер, показали, что каждое соматическое ядро содержит определенное число хромосом, зависящее от вида животного, а также что это число уменьшается вдвое в процессе созревания половых клеток и снова восстанавливается во время оплодотворения. Используя эти ограниченные данные, Вейсман предложил механическую модель клеточной дифференцировки – **теорию зародышевой плазмы**.

Суть этой теории сводилась к следующему. Во-первых, хромосомы яйца и спермия количественно и качественно на равных основаниях участвуют в образовании нового организма. Во-вторых, хро-

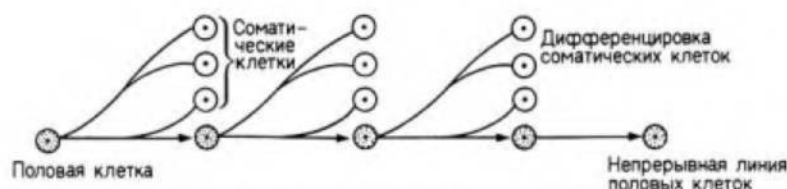


Рис. 8.1. Схема, иллюстрирующая вейсмановскую теорию наследственности. Половая клетка дает начало дифференцирующимся соматическим клеткам тела (белые кружки) и половым клеткам (кружки с точками). (По Wilson, 1896.)

мосомы несут наследственные потенции этого нового организма и являются основой преемственности между поколениями. (Эмбриологи думали об этом еще за 15 лет до того, как вновь были открыты работы Менделя. Вейсман [Weismann, 1892, 1893] также выдвинул гипотезу, что эти ядерные детерминанты наследственности функционируют путем выработки веществ, которые становятся активными в цитоплазме!) Однако не все детерминанты хромосом попадают в каждую клетку зародыша, поскольку хромосомы делятся не поровну, а так, что в разные клетки попадают различные ядерные детерминанты. Вейсман, в прошлом военный врач, уподоблял эти детерминанты армейским бригадам. Если оплодотворенное яйцо должно нести полный набор детерминантов, то определенные клетки будут сохранять «образующие кровь» бригады, а другие клетки — «образующие мышцы» детерминанты. Только в ядрах тех клеток, которые предназначены стать гаметами (половыми клетками), будут оставаться все типы детерминантов. Ядра всех других клеток содержат только часть первоначальных типов детерминантов.

Таким образом, гипотеза Вейсмана предполагала непрерывность половой (зародышевой) плазмы и разнообразие соматических линий. Дифференцировка была обусловлена «сегрегацией ядерных детерминантов» в разных типах клеток и завершалась «архитектурой зародышевой плазмы», т.е. ядром половой клетки. Хромосомы, кажушиеся одинаковыми во всех клетках, должны были быть неравными по своим качествам. Линия половых клеток была полностью *независимой* от соматических клеток. Следовательно, признаки, приобретенные соматическими клетками, не могли наследоваться. Вейсман пытался экспериментально подтвердить эту модель, отрезая хвосты у новорожденных мышей на протяжении 19 поколений и в каждом новом поколении вновь получая мышей с хвостами. Эти данные были использованы им как аргумент в пользу того, что линия половых клеток изолирована от «нападения» (воздействия на нее) соматической ткани¹.

¹ К этому времени основной альтернативой была гипотеза пангенеза. Согласно этой гипотезе, которую сам Дарвин считал временной, каждая соматическая клетка содержит частички (пангены), которые мигрируют обрат-

Вейсмановская теория зародышевой плазмы в графической форме изображена на рис. 8.1. Он показывает непрерывность и бессмертие линии половых клеток в противоположность временному существованию взрослого организма; показывает, как отметил физиолог Майкл Фостер, что «тело животного есть по сути лишь носитель яйца». Вильсон (Wilson, 1896), подчеркивавший, что его замечательный учебник «Клетка в развитии и наследственности» выросла из гипотезы Вейсмана, говорил об историческом значении вейсмановской схемы:

«Смерть индивидуума не означает прекращения непрерывности серии делений клеток, благодаря которой продолжается жизнь расы. Индивидуум умирает, это верно, но половые клетки продолжают жить, как бы неся в себе традиции расы, от которой они произошли, и передавая их своим потомкам».

Вильгельм Ру: мозаичное развитие

Вейсман интуитивно чувствовал, что хромосомы являются носителями наследственности. Однако более важным было то, что он предложил гипотезу, которую можно было проверить очень быстро. Он считал, что первое деление дробления, разделяющее зародыш на будущие правую и левую половины, разделяет также «правые» и «левые» детерминанты

но в половые клетки, снабжая их признаками этой клетки, чтобы передать их потомству. По этой теории Вейсман должен был получить мышей с короткими хвостами. Наиболее убедительным доказательством теории пангенеза было сообщение физиолога Броун-Секара и Уэстфала о том, что экспериментально вызванная эпилепсия у морских свинок может передаваться следующему поколению. Другие анекдотические «доказательства» наследования приобретенных признаков изобиловали ошибками (Thomson, 1907). Опыты Вейсмана с калечением мышей были подтверждены Босом (15 поколений), Копе (11 поколений) и Мантешой и Розенталем (11 поколений). Недавно Томас Джакс, комментируя эти результаты, процитировал слова, которые произносит Гамлет: «Есть, стало быть, на свете божество, / Устраивающее наши судьбы / По-своему.» (В. Шекспир, Трагедия. — Перев. с англ. Б. Пастернака. — М.: РИПОЛ, 1993). Во всяком случае, теория пангенеза была сильно подорвана. Вейсман писал, что дарвиновская гипотеза — это «один из тех несправедливых путей, которыми вынуждена идти наука, чтобы достичь истины».

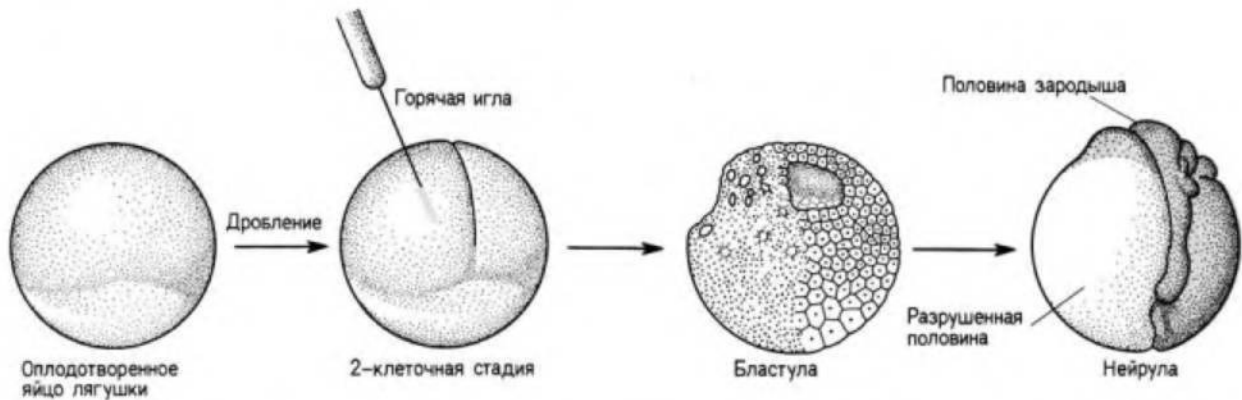


Рис. 8.2. Попытка Ру показать мозаичное развитие. Разрушение одной клетки у 2-клеточного зародыша приводит к развитию только одной половины зародыша.

между двумя бластомерами. Это утверждение было проверено Вильгельмом Ру (W. Roux), молодым немецким эмбриологом, в прошлом учеником Эрнста Геккеля. Ру также был ревностным дарвинистом (в своей первой крупной работе по эмбриологии он высказал предположение о конкуренции между эмбриональными клетками), но, подобно Вейсману, чувствовал, что развитие должно изучаться с помощью аналитических методов. В 1888 г. Ру опубликовал результаты серии опытов, в которых он брал 2- и 4-клеточных зародышей лягушки и разрушал некоторые из клеток каждого зародыша горячей иглой. Из гипотезы Вейсмана следовало, что в этом случае образуется либо правая, либо левая половина зародыша. Ру и в самом деле получал половинные морулы, как то и предсказывал Вейсман (рис. 8.2). Развившиеся из них полунейрулы имели полный набор правой или левой стороны с одним нервным валиком, одной слуховой ямкой (плакодой) и т. д. На основе этих данных Ру пришел к выводу, что зародыш лягушки представляет собой мозаику самодифференцирующихся частей и очень вероятно, что каждая клетка получает свой набор детерминантов и соответственно этому дифференцируется. Этой серией опытов Ру начал свою программу по изучению механики развития (*Entwicklungsmechanik*), обосновывавшую физиологический подход к эмбриологии. Эмбриология, считал Ру, больше не должна быть просто служанкой эволюционных учений. Она должна выполнять свою роль независимой экспериментальной науки.

Ганс Дриш: регуляционное развитие

Никто не приветствовал этот экспериментальный подход к эмбриологии больше, чем другой ученик Геккеля — Ганс Дриш (H. Driesch). Дриш

ставил перед собой цель объяснить развитие с позиций законов физики и математики. Первые его исследования были сходны с исследованиями Ру. Методически опыты Ру были опытами с нанесением *дефектов*; они отвечали на вопрос, как будут развиваться оставшиеся бластомеры, когда часть их разрушена. Дриш (1892) задумал расширить эти исследования, проделав опыты с *изоляцией* бластомеров. Он отделял друг от друга бластомеры морского ежа энергичным встряхиванием (или позже помещением их в бескальциевую морскую воду). К удивлению Дриша, каждый из бластомеров двухклеточного зародыша развивался в полную личинку. Точно также, если Дриш разделял бластомеры 4- и 8-клеточных зародышей, то некоторые из клеток образовывали целые личинки, называемые плутеусами (рис. 8.3). Этот результат поразительно отличался от того, что предсказывали Вейсман или Ру. Вместо самодифференцировки в будущую часть зародыша каждый бластомер мог регулировать свое развитие и давать начало целому организму. Это явление было названо **регуляционным развитием**.

Регуляционное развитие было продемонстрировано Дришем и в других опытах. У морских ежей плоскости двух первых делений дробления являются меридиональными, тогда как третье деление проходит по экватору яйца, разделяя зародыш на четыре верхние и четыре нижние клетки (см. рис. 3.3). Дриш (1893) изменял направление третьего деления, слегка сжимая ранний зародыш между двумя стеклянными пластинками; в результате третье деление также проходило в меридиональной плоскости, как и первые два. Если затем давление ослабляли, то четвертое деление дробления было экваториальным. Эта процедура вызывала перегруппировку ядер, так что ядро, которое в норме должно было оказаться в области, предназначенной формировать энтодерму, теперь попадало в область презумптивной эктодермы. Ядра, которые должны были обра-



А. Нормальный
плутеус

Б. Плутеусы, развившиеся из одной клетки
4-клеточного зародыша

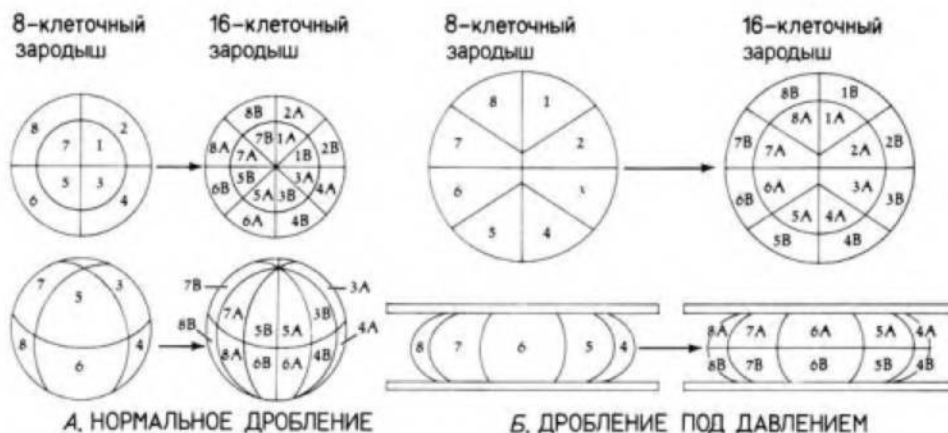
Рис. 8.3. Опыты Дриша, доказавшие существование развития по регуляционному типу. А. Нормальная личинка морского ежа – плутеус. Б. Более мелкие, но нормальные плутеусы; каждый из них развивался из одного blastomera, полученного путем разделения 4-клеточного зародыша на отдельные blastomeres. (Все личинки зарисованы в одном масштабе.) Обратите внимание на то, что все 4 личинки, происшедшие из этих blastomeres (Б), не идентичны, несмотря на их способность образовывать все необходимые типы клеток. (По Hörstadius, Wolsky, 1936.)

зовывать дорсальные структуры, обнаруживались в вентральных клетках (рис. 8.4). Если бы в данном случае происходила сегрегация ядерных детерминантов, то у развившегося из этих клеток зародыша все структуры должны были располагаться в причудливом беспорядке. Однако Дриш получил из этих зародышей нормальных личинок.

Результаты этих опытов оказались очень важными как для эмбриологии, так и лично для Дриша. Во-первых, Дриш показал, что «проспективная потенция» изолированного blastomera (т.е. тот тип клеток, который мог из него произойти) шире, чем его «проспективная судьба» (т.е. те типы клеток, которые должны формироваться из этого blastomera при неизменном ходе его развития). Согласно

же Вейсману и Ру, проспективная потенция и проспективная судьба blastomera должны быть идентичными. Во-вторых, Дриш пришел к выводу, что зародыш морского ежа представляет собой «гармоничную эквипотенциальную систему». Система эта гармонична потому, что все ее потенциально независимые части функционируют вместе, формируя единый организм. В-третьих, судьба ядра зависела исключительно от его положения в зародыше. Дриш (1894) выдвинул гипотезу о серии событий, продвигающих развитие вперед посредством взаимодействия ядра и цитоплазмы:

«Поскольку каждая клетка содержит ядро, она на протяжении онтогенеза несет в себе всю сумму зачатков; поскольку она содержит специфическое



А. НОРМАЛЬНОЕ ДРОБЛЕНИЕ

Б. ДРОБЛЕНИЕ ПОД ДАВЛЕНИЕМ

Рис. 8.4. Схема, иллюстрирующая результаты опыта Дриша со сдвиганием дробящихся зародышей для изменения распределения ядер. А. Нормальное дробление у зародыша морского ежа в возрасте от 8 до 16 клеток; вид с анимального полюса (вверху) и сбоку (внизу). Б. Аномальное положение плоскостей деления blastomeres, формирующееся под давлением; вид с анимального полюса и сбоку. (По Huxley, de Beer, 1934.)

Таблица 8.1. Экспериментальные методики и результаты Ру и Дриша

Исследователь	Организм	Тип опыта	Заключение	Соотношение между потенцией и судьбой клеток
Ру (1888)	Лягушки (<i>Rana temporaria</i> [fusca] и <i>Rana esculenta</i>)	Повреждение	Мозаичное развитие (самодифференцировка)	Проспективная потенция равна проспективному значению
Дриш (1892)	Морской еж (<i>Echinus microtuberculatus</i>)	Изоляция	Регуляционное развитие	Проспективная потенция шире, чем проспективное значение
Дриш (1893)	Морские ежи (<i>Echinus</i> и <i>Paracentrotus</i>)	Рекомбинация	Регуляционное развитие	Проспективная потенция шире, чем проспективное значение

цитоплазматическое клеточное тело, это позволяет ей реагировать только на специфические воздействия... Когда в какой-либо клетке активируется ядерный материал, цитоплазма этой клетки, которая влияла на ядро, сама в свою очередь оказывается под влиянием ядра и изменяется; таким образом, устанавливается основа для нового элементарного процесса, который является не только результатом, но также и причиной изменений».

Эта удивительно современная концепция ядерно-плазменного взаимодействия и равноценности ядер оказалась не по силам Дришу. Рассматривать зародыш как физическую машину было уже невозможно, ведь зародыш можно было разделить на части, каждая из которых была способна воссоздать целый организм. Другими словами, Дриш пришел к убеждению, что развитие не может быть объяснено физическими силами. И чтобы объяснить, каким образом происходит развитие, он был вынужден призвать на помощь жизненную силу — *энтелехию* («внутреннюю силу, направляющую к цели»). В сущности, зародыш должен быть наполненным внутренним духом и мудростью, чтобы осуществить свои цели, несмотря на препятствия, которые ставят на его пути эмбриологи. Неспособный объяснить свои результаты с позиций физики его времени, Дриш отказался от изучения физиологии развития, стал профессором философии и продолжал провозглашать витализм вплоть до своей смерти в 1941 г.

Различия в опытах Ру и Дриша суммированы в табл. 8.1. Различия между опытами по нанесению дефектов и изоляции, а также важность взаимодействий, обеспечиваемых разрушенными бластомерами, были выяснены в опытах Мак-Клендона (McClendon, 1910), показавших, что изолированные бластомеры лягушки ведут себя точно так же, как изолированные бластомеры морского ежа. Следовательно, мозаичное развитие бластомеров лягушки в исследованиях Ру было артефактом, полученным в опытах с нанесением дефекта. Что-то в мертвом

бластомере или на нем все еще информировало живые клетки о его существовании. Мы видели также, что ранние бластомеры млекопитающих обладают регуляционным типом развития. Как уже обсуждалось в гл. 3, каждый изолированный бластомер внутренней клеточной массы у мыши способен генерировать целую фертильную мышь. Такие факты, как слияние двух и более ранних зародышей мыши в один нормальный зародыш (см. рис. 3.3) или рождение идентичных близнецов, также свидетельствуют о том, что ранние бластомеры млекопитающих способны к регуляции. Поэтому, хотя Вейсман и Ру были пионерами исследований в области физиологии развития, их предположение о том, что причиной дифференцировки является сегрегация ядерных детерминантов, вскоре было опровергнуто.

Свен Гёрстадиус: потенции и градиенты в ооците

Но и Дриш оказался прав не на 100%. Как мы видели в предыдущей главе, существует много животных, развитие которых представляет собой главным образом мозаику самодифференцирующихся частей. Более важно, однако, что даже зародыши морского ежа не представляют собой коллекцию полностью эквивалентных клеток. Шведский биолог Свен Гёрстадиус в серии опытов, проведенных с 1928 по 1935 г., отделял тонкими стеклянными иглами разные слои ранних зародышей морского ежа и наблюдал их последующее развитие (Hörstadius, 1928, 1939). Если он разделял 8-клеточный зародыш пополам по меридиану, проходящему через анимальный и вегетативный полюсы, то из обеих половин развивались личинки — плутеусы, как и предсказывал Дриш. Но если зародыши на той же стадии разделяли пополам по экватору (т.е. на анимальную и вегетативную половины), то ни одна из частей не развивалась в нормальную личинку (рис. 8.5). Анимальная половина превращалась в полый шар, образованный реснитчатыми

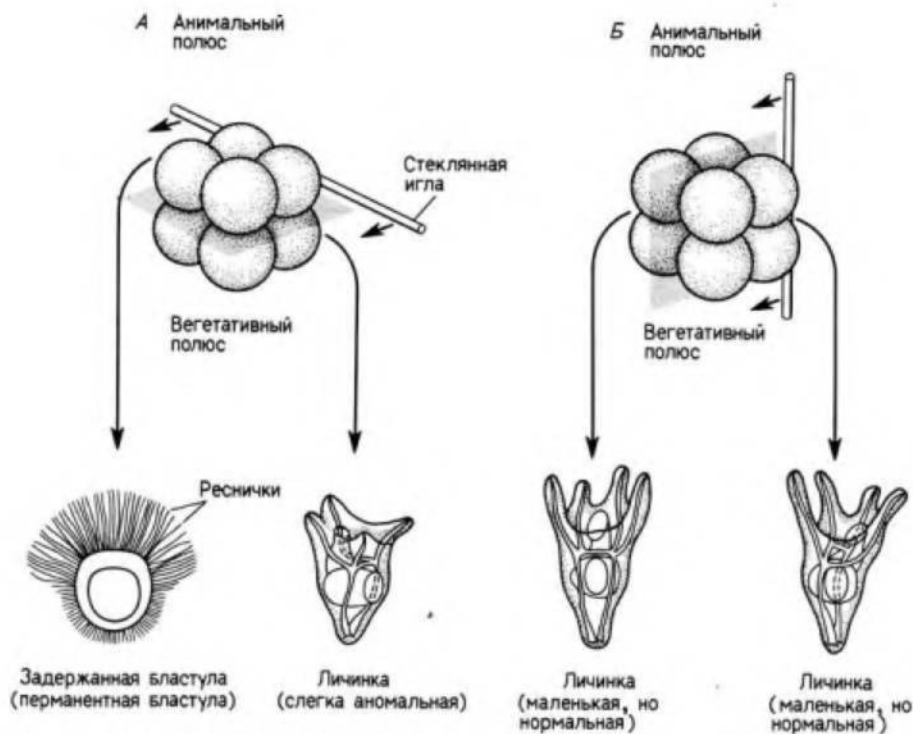


Рис. 8.5. Ранняя асимметрия у зародышей морского ежа. А. Если четыре анимальных бластомера отделить от четырех вегетативных и дать возможность каждой половине развиваться по отдельности, то анимальные клетки формируют снабженную ресничками *задержанную бластулу*, а вегетативные клетки – личинку с расширенной кишкой. Б. Если 8-клеточный зародыш разделить так, чтобы каждая половина содержала анимальные и вегетативные клетки, то развиваются мелкие, нормального вида личинки.

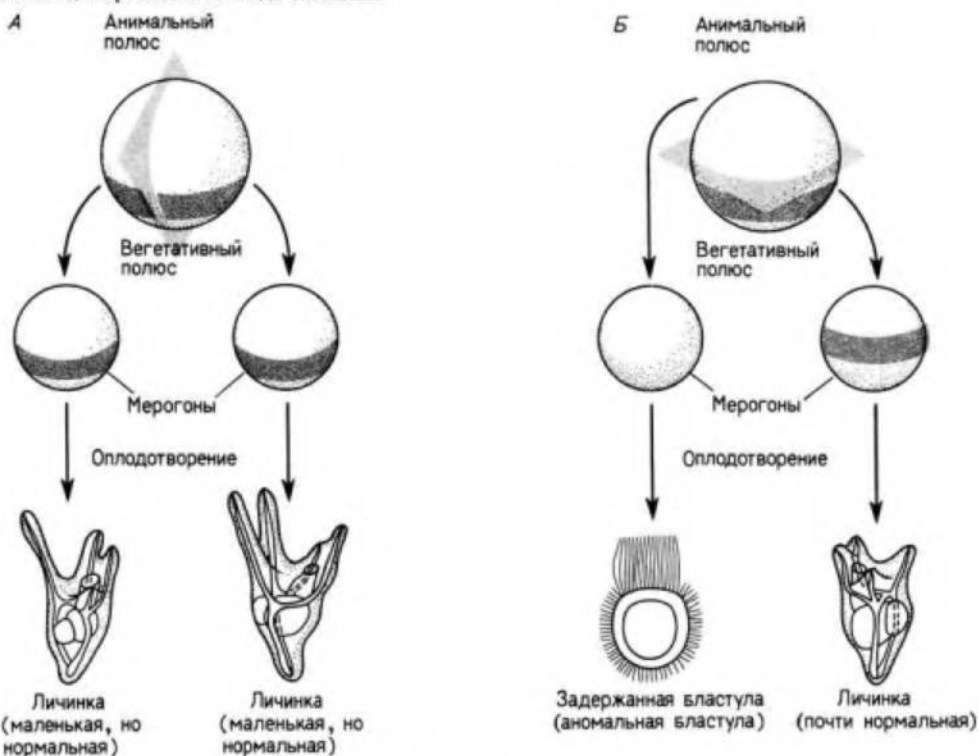


Рис. 8.6. Асимметрия в яйце морского ежа. А. Когда Гёрстадиус разделял яйцо морского ежа в меридиональной плоскости так, что обе половины (мерогоны) содержали анимальную и вегетативную цитоплазму, развивались мелкие, нормального вида плутеусы. Б. После того как яйцо морского ежа было разделено на анимальную и вегетативную половины и обе половины оплодотворены, из анимальной половины развивалась покрытая ресничками *задержанная бластула*, а из вегетативной – плутеус с расширенной кишкой.

эпидермальными клетками (называемый **Dauerblastula** – продолженная или задержанная бластула), а вегетативная половина развивалась в слегка аномальный зародыш с расширенной кишкой. Гёрстадиус смог повторить эти результаты, разрезая пополам яйца морского ежа и оплодотворяя обе половины по отдельности. У морских ежей фрагменты яиц (**мерогон**ы) могут делиться и развиваться, даже если они имеют гаплоидное ядро. Если спермий проникает в половину, не содержащую гаплоидного ядра яйца, то мерогон также будет развиваться (рис. 8.6). Когда яйцо разрезали меридионально, из обеих половин яйца развивались нормальные зародыши. Однако когда яйцо разрезали экваториально, то после оплодотворения обеих половин из фрагментов формировались или окаймленный ресничками анимальный шарик, или зародыш с расширенной вегетативной кишкой. Следовательно, даже зародышам морского ежа, по-видимому, в некоторой степени присущ мозаицизм, по меньшей мере по анимально-вегетативной оси.

Эти наблюдения побудили Гёрстадиуса осуществить, пожалуй, один из наиболее поразительных опытов в истории эмбриологии. Сначала (1935) он проследил нормальное развитие шести слоев клеток у 64-клеточного зародыша морского ежа. Как показано на рис. 8.7, *А*, анимальные клетки и первый вегетативный слой (Ve_1) в норме образуют эктодерму, второй вегетативный слой (Ve_2) дает начало энтодерме и части личиночной мезодермы, а из микромеров развивается мезодермальный скелет.

Затем Гёрстадиус удалял у 64-клеточного зародыша оболочку оплодотворения, отделяя слои один от другого тонкими стеклянными иглами, и рекомбинировал их в разных сочетаниях. Изолированное анимальное полушарие превращалось в задержанную бластулу из эктодермальных клеток, покрытых ресничками (рис. 8.7, *Б*). Такой зародыш был назван анимализированным. Если Гёрстадиус комбинировал анимальное полушарие со слоем Ve_1 (рис. 8.7, *В*), то получившаяся в результате личинка была менее анимализированной; у нее было подавлено образование ресничек и формировалась часть кишки. Если же анимальное полушарие было соединено со слоем Ve_2 (рис. 8.7, *Г*), то развивалась личинка, выглядевшая нормальной. В этой комбинации слой Ve_2 , который в норме формирует только архентерон и его производные, теперь формировал также скелетные структуры. Сходным образом, когда анимальную половину комбинировали только с микромерами (рис. 8.7, *Д*), формировался маленький, выглядевший нормальным плутеус, но в этом случае энтодерма была полностью образована анимальными клетками. У такого плутеуса кишка возникала из клеток, которые в норме должны были образовать снабженную ресничками экто-

дерму. Эти опыты показали, что даже на 64-клеточной стадии анимальные клетки сохраняют генетический потенциал к образованию клеток кишки. Еще более важным было то, что способность к подавлению «анимализации» носит **градиентный характер**. Микромеры были более сильными «вегетализаторами», чем слой Ve_2 ; но слой Ve_2 в свою очередь был сильнее, чем слой Ve_1 .

Следующая серия опытов Гёрстадиуса подтвердила существование анимализирующего фактора, который также распределен по градиенту. Микромеры комбинировали с каждым слоем 64-клеточного зародыша по отдельности. Изолированный слой An_1 (рис. 8.8, *А*) должен был образовывать задержанную бластулу. Когда к этому слою добавляли различное число изолированных микромеров, причем число их постоянно увеличивали, развивались все более полные зародыши. Комбинация только слоя An_1 с четырьмя микромерами приводила к образованию нормального плутеуса. Из слоя An_2 нормальный плутеус развивался уже при комбинации с двумя микромерами (рис. 8.8, *Б*), а добавление четырех микромеров приводило к аномальному увеличению энтодермальных структур. Из слоя Ve_1 без добавления микромеров образуется также только задержанная бластула. Однако добавление даже одного микромера вызывало резкое увеличение кишки (рис. 8.8, *В*), а изолированный слой Ve_2 вообще имел тенденцию к вегетализации без добавления каких-либо микромеров (рис. 8.8, *Г*). Таким образом, существует, по-видимому, градиент анимализации, усиливающийся по направлению от An_1 к микромерам.

Наиболее логичным объяснением этих результатов было предположение, что существуют два противоположно направленных градиента: вегетализирующий градиент с максимумом активности на вегетативном полюсе и анимализирующий градиент с максимальной активностью на анимальном полюсе. Именно такую систему двойных градиентов предложил старший коллега Гёрстадиуса Дж. Рунстрем (Runnstrom, 1929). Поскольку для развития более важны относительные, а не абсолютные концентрации различных веществ, рекомбинация blastomeres из двух полюсов восстанавливает все промежуточные значения градиентов. Сходным образом промежуточные клетки, еще содержащие максимум и минимум для обоих градиентов, также могут дать начало нормальному плутеусу (рис. 8.9). Эта модель двойного градиента оказалась очень полезной для объяснения других рекомбинационных опытов. Например, если микромеры из вегетативного полюса пересеживали в область, близкую к центру 32-клеточного зародыша, то они инвагинировали в blastocoel хозяина, где вызывали формирование хорошо развитого вторичного архентерона

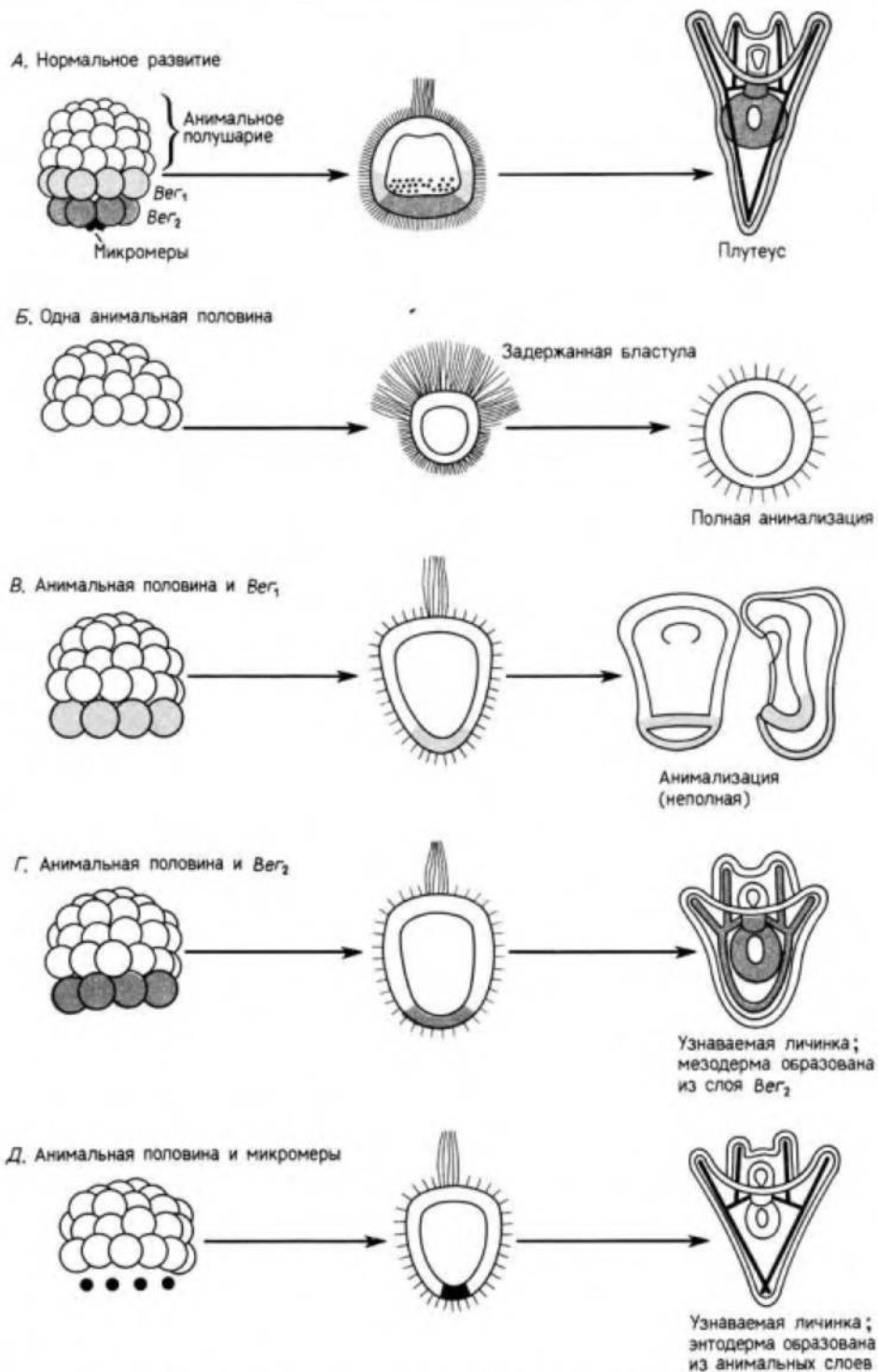


Рис. 8.7. Обнаружение вегетализирующего градиента в опытах Гёрстадиуса. А. Судьба каждого клеточного слоя зародыша морского ежа на стадии 64 клеток, прослеженная от бластулы до стадии плутеуса. Различные клеточные слои обозначены разными оттенками серого цвета, а микромеры – черным (как на рис. 4.1). Б. Судьба изолированной анимальной половины. В. Рекомбинация анимальной половины со слоем клеток Ber_1 . Г. Рекомбинация анимальной половины со слоем клеток Ber_2 . Д. Анимальная половина и микромеры. (По Hörstadius, 1939.)

Изолированные слои	+1 микромер	+2 микромера	+4 микромера
An_1 А  Задержанная бластула			 Нормальная личинка
An_2 Б 		 Нормальная личинка	 Слабо вегетализованная личинка
Ver_1 В  или  Вегетализированная личинка			
Ver_2 Г  Вегетализация			

Рис. 8.8. Обнаружение анимализирующего градиента в опытах Гёрстадиуса. Каждый слой 32-клеточного зародыша морского ежа был изолирован и затем рекомбинирован с 0, 1, 2 или 4 микромерами. Чтобы из клеток, происходящих из слоя An_1 , сформировался нормальный плутеус, необходимы все 4 микромера (А), но чтобы плутеус образовался из слоя An_2 , достаточно двух микромеров. Слой Ver_1 развивается в вегетализованную личинку уже с одним микромером (В), а в клетках слоя Ver_2 вообще отсутствуют анимализирующие свойства, достаточные, чтобы сформировался нормальный плутеус (Г). (По Hörstadius, 1935.)

(рис. 8.10). Если же микромеры имплантировали на анимальный полюс, то формировалась очень маленькая вторичная кишка. Вместе с тем из зародышей не удалось выделить ни вегетативный, ни анимальный факторы. Ингибиторы белков (тяжелые металлы, $NaSCN$, краситель синий Эванса), по-видимому, уменьшали вегетализирующий градиент и таким способом анимализировали зародыш. Ингибиторы дыхания (CO , KCN , NaN_3 , Li) вегетализировали зародыш. Так, Убишу (Ubisch, 1929) удалось получить нормальный плутеус из анимальной половины, которая развивалась в растворе хлористого лития. Литий, по-видимому, ослабляет анимальную часть градиента в пределах анимальных клеток и тем самым способствует сбалансированному развитию этого полушария.

Таким образом, мы имеем модель регуляционного развития, основанную на относительных кон-

центрационных градиентах в ооците. Когда анимальные клетки комбинируют только с микромерами, формируется нормальный плутеус с клетками кишки, происходящими из анимальных клеток, которые в норме должны были формировать эктодерму. Следовательно, и на более поздних стадиях развития потенции клеток все еще шире, чем их судьба. Но из одних анимальных клеток теперь образуется только анимализированная бластула, так что способность одной клетки дать начало целой личинке исчезла. Другими словами, ее потенции стали ограниченными. Любая клетка с определенным соотношением анимальных и вегетативных веществ будет продуцировать определенный тип клеток. Следовательно, клетки анимального полюса с более высоким отношением анимального фактора к вегетативному в норме будут образовывать эктодермальную ткань. Однако некоторые ани-

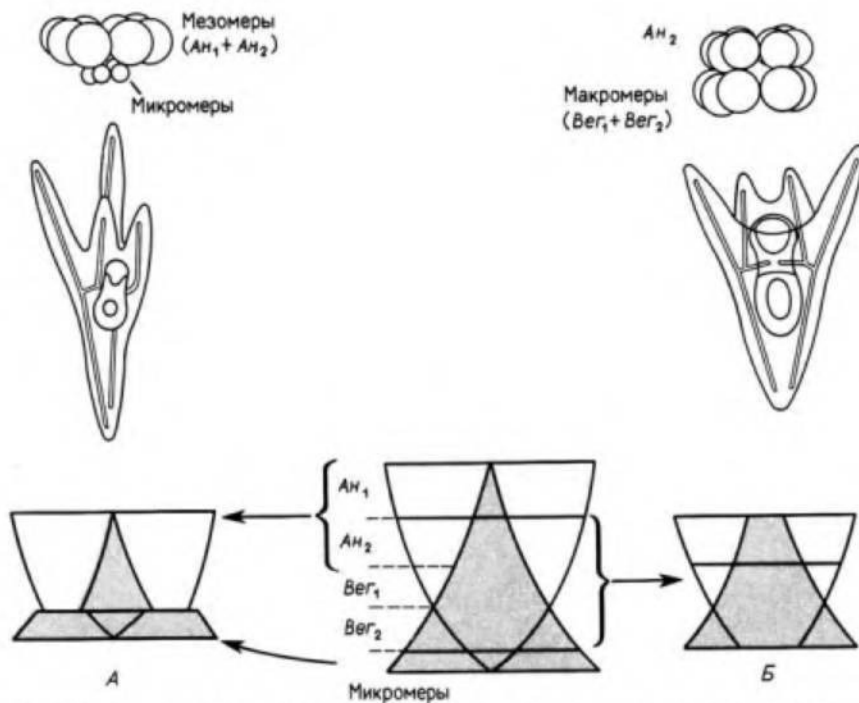


Рис. 8.9. Развитие плутеуса из наружных и промежуточных клеток 32-клеточного зародыша морского ежа. А. К слою мезомеров ($An_1 + An_2$) добавлены микромеры. Б. Слои An_2 с добавлением макромеров (будущие слои Ber_1 и Ber_2), но без двух крайних слоев (An_1 и микромеры). В обоих случаях образуются плутеусы. Каждый рисунок в нижнем ряду представляет собой гипотетический градиент. (По Czihak, 1971.)

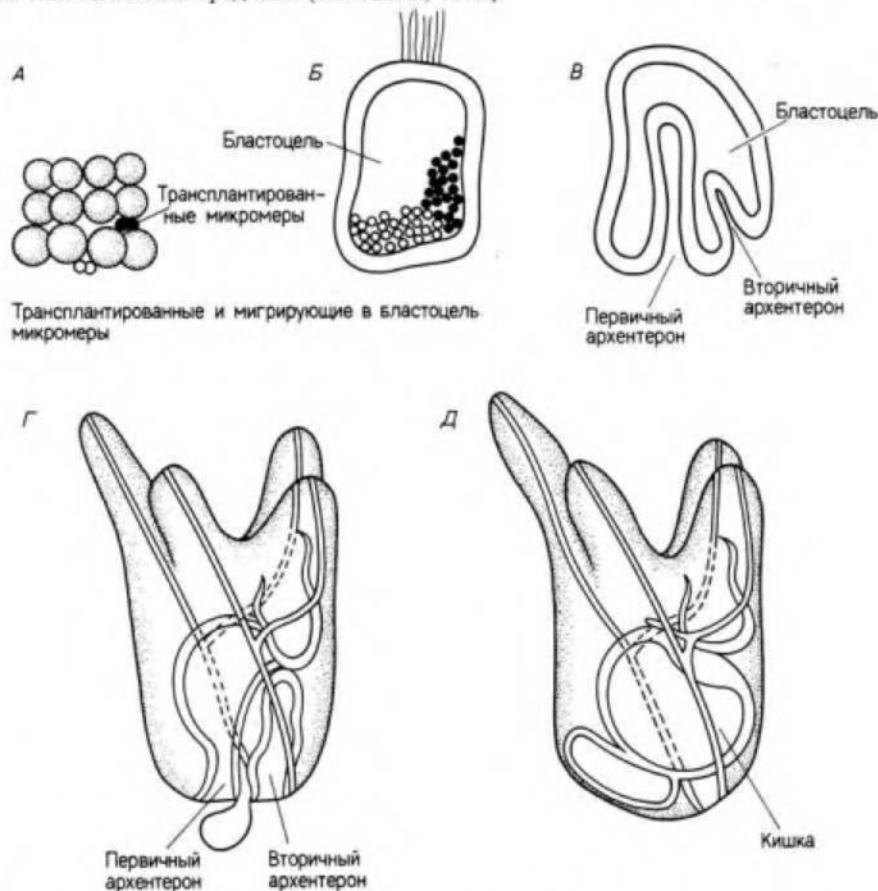


Рис. 8.10. А. Микромеры, взятые из области вегетативного полюса (обозначены черным), пересекаются в область между анимальной и вегетативной половиной 32-клеточного зародыша. Б. Микромеры инвагинируют в бластоцель. В. Формируется вторичный архентерон и в конечном счете плутеус (Г), имеющий два архентерона. Д. Эти два отдельных архентерона позже сливаются в одну большую кишку. (По Hörstadius, 1935.)

мальные клетки, рекомбинированные с сильным источником вегетативного фактора, будут формировать ткань кишки. Если зародыш разделен таким образом, что каждая половина содержит полный анимальный и вегетативный градиенты (т.е. разделение произведено по меридиану, проходящему вдоль анимально-вегетативной оси), то формируется полная личинка. Бластомеры остаются способными к регуляции до тех пор, пока не будут формироваться исключительно из анимальной или вегетативной цитоплазмы. Поэтому неудивителен тот факт, что после 32-клеточной стадии большая часть бластомеров по отдельности более не может дать начало целой личинке (Morgan, 1895), а микромеры с 16-клеточной стадии уже неспособны к этому (Hagstrom, Lonning, 1965; Okazaki, 1975). Даже для зародыша, развитие которого является регуляционным, наступает время, когда потенции его клеток становятся ограниченными.

Ганс Шпеман: прогрессивная детерминация эмбриональных клеток

В предыдущем разделе главы были приведены данные о регуляционном типе развития. Мы отметили два главных аспекта регуляции: 1) потенция изолированных бластомеров в эмбриогенезе шире, чем их нормальная судьба, и 2) бластомеры, перемещенные в другую область зародыша, развиваются согласно их новому положению. Оба этих явления характерны для ранних стадий дробления морского ежа. Однако впоследствии бластомеры морского ежа становятся коммитированными к их различным перспективным значениям. Гёрстадиусу удалось связать ограничение потенций с ориентацией плоскости делений дробления, поскольку бластомеры могли регулировать развитие лишь до тех пор, пока они имели достаточно материала как из анимальной, так и из вегетативной частей яйца. В 1918 г. Ганс Шпеман (H. Spemann) из Фрайбургского университета обнаружил, что сходная ситуация наблюдается и в яйце тритона. Опыты, с помощью которых он и его коллеги анализировали это явление в течение более чем 20 лет, заложили основу большей части наших знаний о физиологии развития и обусловили присуждение Шпеману Нобелевской премии в 1935 г.

Шпеман, подобно Ру и Дришу, решил проверить гипотезу Вейсмана и с помощью остроумной методики доказал, что ядра ранних бластомеров тритона идентичны, т.е. каждое из них способно обеспечить развитие целой личинки. Пользуясь волоском ребенка в качестве лигатуры, он перевязывал им яйцо тритона вскоре после оплодотворения в плоскости

первого деления дробления. Затем он несколько стягивал петлю так, что все деления ядер происходили лишь в одной из половин. Наконец на стадии 16 бластомеров одно ядро смогло проскользнуть через перетяжку в безъядерную половину. Дробление начиналось и в этой половине, а петлю, накинутаю на яйцо, Шпеман стягивал все сильнее, пока не разделял яйцо на две изолированные половины. В результате развивались два зародыша-близнеца, причем один был немного старше другого (рис. 8.11). Результаты этого опыта позволили Шпеману сделать вывод, что ядра ранних зародышей амфибий идентичны и каждое способно обеспечить развитие целого организма. В этом отношении бластомеры амфибий были сходны с бластомерами морских ежей.

Однако, когда Шпеман проделал сходный опыт с перетягиванием яйца также лонгитудинально, но перпендикулярно к плоскости первого деления дробления (т.е. разделял яйцо не на левую и правую половины, а на будущую спинную и брюшную стороны), он получил совершенно другой результат! По обе стороны от лигатуры ядра продолжали делиться, но лишь из клеток одной стороны образовалась нормальная личинка. Из другой половины возникла только неорганизованная масса ткани, названная Шпеманом *Bauchstück* – «кусочек живота». Эта масса тканей представляла собой шарик эпидермальных клеток (эктодерма), содержащий внутри кровь и мезенхиму (мезодерма) и клетки кишки (энтодерма), но в нем не было дорсальных структур, таких, как нервная система, хорда или сомиты (рис. 8.12).

Почему описанные выше два опыта дали разные результаты? Не могло ли это быть вызвано тем, что при первом делении яйца, когда плоскость деления проходила перпендикулярно к нормальной плоскости первого деления дробления, некоторые цитоплазматические вещества неравномерно распределялись по двум половинам? К счастью, яйцо тритона оказалось очень удобным для получения ответа на этот вопрос. Как уже говорилось в гл. 2 и 4, в яйцах амфибий после оплодотворения происходит резкое смещение кортикального слоя цитоплазмы и у некоторых видов амфибий такое движение приводит к образованию серого серпа в области, прямо противоположной месту проникновения спермия в яйцо. Кроме того, плоскость первого деления дробления обычно делит эту область поровну между двумя бластомерами, из которых, если их отделить друг от друга, развиваются две нормальные личинки. Однако, если плоскость первого деления отклоняется от середины серого серпа (в редких случаях спонтанно или в опыте, в котором исследователь перетягивает яйцо волосной петлей перпендикулярно плоскости нормального деления), то материал

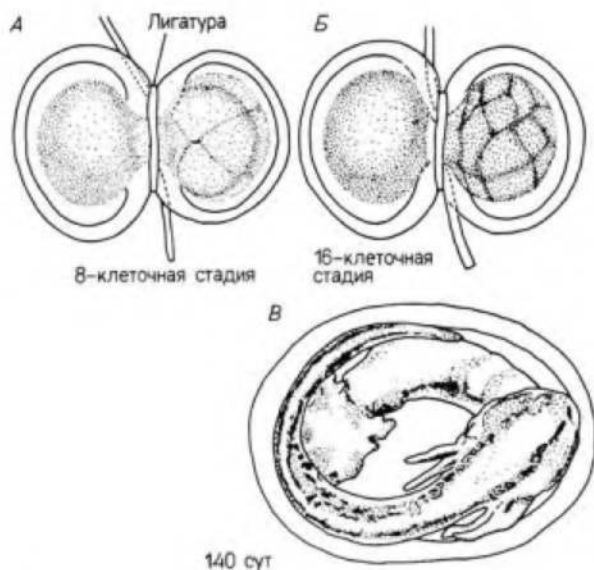
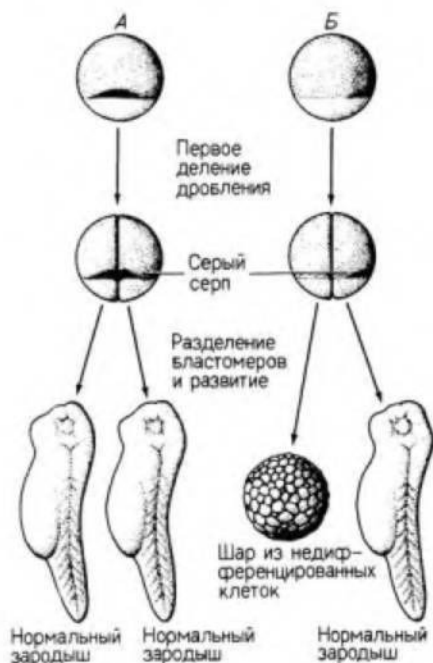


Рис. 8.11. Опыты Шпемана, показавшие равноценность ядер у зародышей тритона в период дробления. А. Если на оплодотворенное яйцо тритона *Triturus vulgaris* (= *T. taeniatus*) накладывали лигатуру, то ядро оказывалось в одной половине зародыша. Когда дробление в этой половине доходило до стадии 8 бластомеров, безъядерная половина оставалась неразделенной. Б. На 16-клеточной стадии в эту половину перешло одно ядро, и лигатура была снята еще сильнее — до полного разделения двух половин в яйцевой оболочке. В. Через 140 сут каждая половина яйца развивалась в нормального зародыша. (По Spemann, 1938.)



серого серпа может попасть только в один из двух бластомеров. Шпеман обнаружил, что когда эти два бластомера разделены полностью, нормально развивается только тот бластомер, который содержит материал серого серпа.

Отсюда следует, что в области серого серпа содержится, по-видимому, какой-то фактор, весьма существенный для правильного развития зародыша. Но как этот фактор действует? Какую роль играет в нормальном развитии? Наиболее важный ключ к решению этого вопроса дает судьба области серого серпа. Показано, что из нее образуются клетки, которые инициируют гаструляцию и формируют спинную губу бластопора. Клетки спинной губы бластопора (см. гл. 4) запрограммированы, чтобы инвагинировать внутрь зародыша и, таким образом, начинать гаструляцию и формирование архентерона. Поскольку все будущее развитие амфибий зависит от взаимодействия клеток, перемещающихся в процессе гаструляции, Шпеман предположил, что материал серого серпа играет решающую роль в инициации гаструляции и что в период гаструляции в развитии зародыша происходят кардинальные изменения.

В 1918 г. Шпеман показал, что в период гаструляции действительно резко меняется потенция клеток. Он обнаружил, что клетки *ранней* гаструлы еще не детерминированы к их конечной дифференцировке, тогда как на стадии *поздней* гаструлы судьба клеток уже определена. Шпеман произвел пересадки тканей на стадии ранней гаструлы у двух различных пигментированных видов тритонов (рис. 8.13). Если участок презумптивного эпидермиса трансплантировали в область будущей нервной пластинки, то он превращался в нервную ткань. А если клетки презумптивной нервной пластинки пересаживали в область будущего эпидермиса живота, то они становились эпидермальными (табл. 8.2). Следовательно, клетки ранней гаструлы тритона не были коммитированы к специфическому типу дифференцировки. Их проспективные потенции были все еще шире их проспективного значения. Принято говорить о **зависимом развитии** этих клеток, поскольку их судьба зависит от их локализации в зародыше. Однако, когда такие же самые гетеропластические (межвидовые) пересадки были осуществлены на стадии *позд-*

Рис. 8.12. Асимметрия в яйце амфибий. А. Если плоскость первого деления дробления делит яйцо на две половины, в каждую из которых попадает половина серого серпа, то оба бластомера после их изоляции друг от друга развиваются в нормальных зародышей. Б. Если весь серый серп попадает в один из двух бластомеров, то нормальный зародыш образуется только из бластомера, содержащего серый серп. Из другого формируется масса неорганизованной ткани, лишенной дорсальных структур. (По Spemann, 1938.)

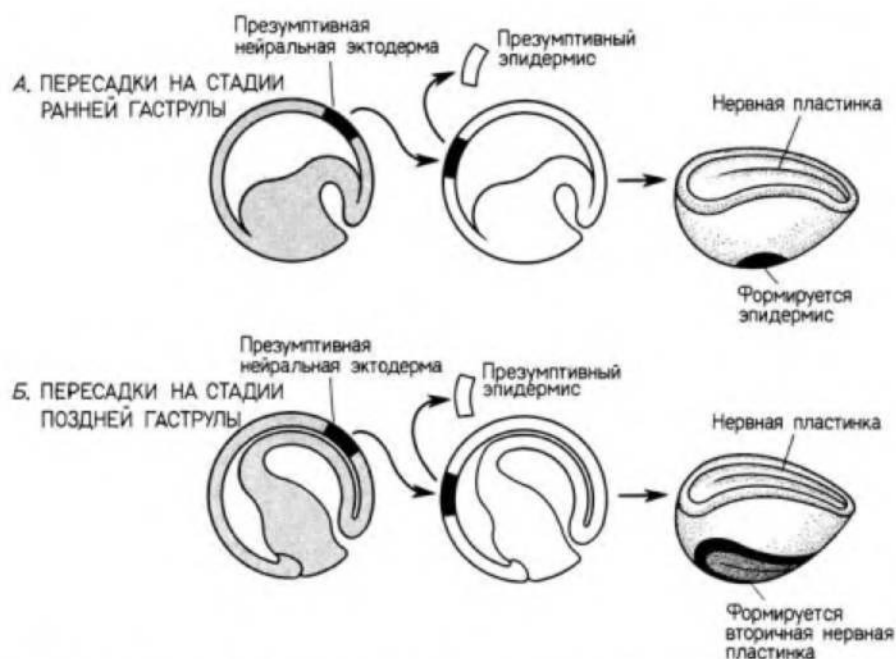


Рис. 8.13. Детерминация эктодермы в период гаструляции у тритона. Презумптивную нейральную эктодерму от одного зародыша тритона пересаживали другому зародышу в область, которая в норме становится эпидермисом. А. Если пересадку производили на стадии ранней гаструлы, то презумптивная нервная ткань развивалась в эпидермис и была видна только одна нервная пластинка. Б. Если такую же операцию проводили на стадии поздней гаструлы, то презумптивные нервные клетки формировали нейральную ткань и у хозяина формировались две нейральные области. (По Saxén, Toivonen, 1962.)

ней гаструлы, Шлеман получил совершенно другой результат. Вместо того чтобы регулировать собственную дифференцировку в соответствии со своим новым положением, трансплантированные клетки обнаружили **независимое** (или **автономное**) **развитие**. Их проспективное значение уже было зафиксировано, и клетки развивались независимо от своего нового положения в зародыше. Презумптивные

нервные клетки теперь образовывали нервную ткань даже в том случае, когда их помещали в область будущего эпидермиса, а презумптивный эпидермис формировал кожу, даже будучи помещенным в область презумптивной нервной трубки. Следовательно, за время, прошедшее от стадии ранней гаструлы до стадии поздней гаструлы, потенции этих групп клеток сузились, так что они

Таблица 8.2. Результаты пересадок тканей на стадиях ранней и поздней гаструлы у тритона

Область донора	Область хозяина	Дифференцировка ткани донора	Заключение
РАННЯЯ ГАСТРУЛА			
Презумптивные нейроны	Презумптивный эпидермис	Эпидермис	Зависимое развитие
Презумптивный эпидермис	Презумптивные нейроны	Нейроны	Зависимое развитие
ПОЗДНЯЯ ГАСТРУЛА			
Презумптивные нейроны	Презумптивный эпидермис	Нейроны	Независимое развитие (детерминированное)
Презумптивный эпидермис	Презумптивные нейроны	Эпидермис	Независимое развитие (детерминированное)

смогли следовать только одному своему специфическому пути дифференцировки. Эти клетки теперь можно назвать **детерминированными**. Под детерминацией подразумевается коммитирование (предназначение) клеток к тому, чтобы в конечном счете дифференцироваться именно в этот, а не в какой-либо иной специфический тип. Поэтому на стадии поздней гаструлы клетки анимального полюса на той стороне, где закладывается спинная губа blastopora, коммитированы (детерминированы) к образованию нервной ткани в любом месте, куда бы они ни попадали (включая чашку Петри). Их развитие уже не поддается регуляции, и они не могут превратиться в клетки других типов. Следует отметить, что критерием для определения состояния детерминации служит поведение клеток в условиях опыта. Никаких явных изменений в клетках не происходит, и еще не видно никаких признаков их дифференцировки. Молекулярные основы детерминации остаются одной из главных и пока нерешенных проблем биологии развития.

Ганс Шпеман и Гильда Мангольд: первичная эмбриональная индукция

Ганс Шпеман и Гильда Мангольд в 1924 г. опубликовали результаты наиболее эффектных

опытов по трансплантации. Они показали, что единственной самодифференцирующейся областью на стадии ранней гаструлы является область спинной губы blastopora и что она действительно инициирует гаструляцию и эмбриогенез в окружающей ткани. В этих опытах Шпеман и Мангольд использовали зародышей двух по-разному пигментированных видов тритона: сильно пигментированного обыкновенного тритона [*Triturus vulgaris* (*taeniatus*)] и непигментированного (светлого) гребенчатого тритона (*Triturus cristatus*). Препарируя зародышей, Шпеман и Мангольд по окраске с легкостью могли различить ткани донора и хозяина. Спинную губу blastopora (материал дорсальной краевой зоны), взятую от зародышей гребенчатого тритона на стадии ранней гаструлы, пересаживали зародышу обыкновенного тритона, находящемуся на той же стадии, в область, предназначенную стать брюшным эпидермисом (рис. 8.14, А). В отличие от других тканей гаструлы, которые развивались согласно своему новому положению, губа blastopora донора не стала брюшным эпидермисом. Она инвагинировала, как делала бы это на своем обычном месте (обнаруживая тем самым свою детерминированность), и исчезала под клетками вегетативного полушария. Светлоокрашенные ткани донора затем продолжали дифференцироваться в хордомезодерму и другие мезодермальные структуры, образова-

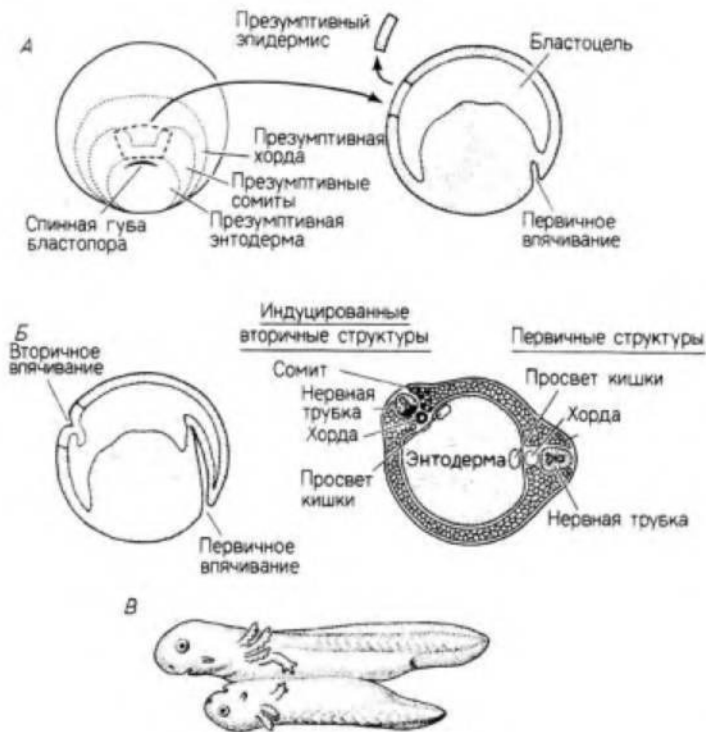


Рис. 8.14. Самодифференцировка материала спинной губы blastopora. Спинную губу blastopora, взятую у зародыша на стадии ранней гаструлы (А), пересаживали другому такому же зародышу в область, которая в норме должна стать брюшным эпидермисом. Б. Трансплантат инвагинирует и формирует второй архентерон, а затем вторичные осевые структуры. В образовании этой новой нервной трубки, хорды и сомитов участвуют как клетки донора (на рисунке обозначены черным цветом), так и хозяина (обозначены белым цветом). В. В результате формируется вторичный зародыш, соединенный с зародышем-хозяином.

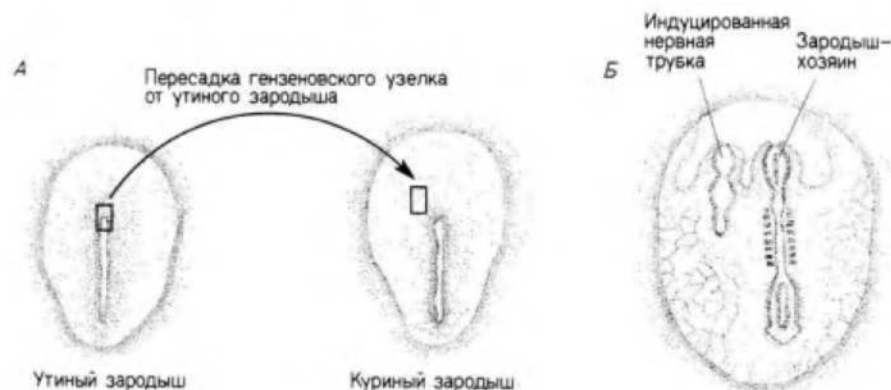


Рис. 8.15. Индукция новых осевых структур зародыша гензеновским узелком. А. Область гензеновского узелка, взятая у зародыша утки, имплантирована хозяину—куриному зародышу. Б. На месте трансплантата индуцировалась дополнительная нервная трубка. (По Waddington, 1933.)

ние которых соответствовало собственной судьбе материала спинной губы бластопора. После того как сформировались эти вторичные осевые структуры, клетки хозяина начали также принимать участие в образовании нового зародыша, давая начало органам, которыми они никогда не должны были стать. Например, сомиты содержали как бесцветную (донорскую), так и пигментированную (хозяйскую) ткань. Но наиболее поразительным оказалось то, что хордомезодерма была способна, взаимодействуя с лежащими над ней эктодермальными клетками, индуцировать образование всей нервной пластинки. В некоторых случаях «лицом к лицу» с зародышем-хозяином формировался вторичный зародыш (рис. 8.14, Б). Эти методически трудные опыты были недавно повторены с использованием ядер-маркеров: результаты опытов Шпемана и Мангольд подтвердились (Gimlich, Cook, 1983; Recanzone, Harris, 1985)¹.

Процесс, посредством которого одна область зародыша, взаимодействуя с другой, побуждает эту область развиваться в направлении ином, чем она развивалась бы без этого воздействия, называют **индукцией**. Поскольку в эмбриогенезе происходят самые разнообразные многочисленные индукционные взаимодействия, это ключевое взаимодействие, в котором дорсальная мезодерма индуцирует эктодерму к дифференцировке в нейральные структуры, получило название **первичной эмбриональной индук-**

ции¹. Область спинной губы бластопора Шпеман назвал **организатором**. Теперь известно (главным образом благодаря Шпеману и его ученикам), что взаимодействия между хордомезодермой и эктодермой недостаточно, чтобы «организовать» целого зародыша. Точнее, это взаимодействие инициирует серию индукционных процессов. Мы также знаем теперь, что спинная губа бластопора сходным образом «организует» вторичного зародыша у *Amphioxus* (ланцетника), круглоротых и различных видов амфибий. Передняя часть первичной полоски (т. е. гензеновский узелок—область, в которой начинается гастрюляция у птиц и млекопитающих) действует сходным образом, инициируя образование вторичных зародышей у этих классов позвоночных (Waddington, 1933, рис. 8.15).

Региональная специфичность индукции

Одним из наиболее любопытных явлений в первичной эмбриональной индукции является региональная специфичность образующихся нейральных структур. Переднемозговая (архенцефалическая), заднемозговая (дейтеренцефалическая) и спинокаудальная области нервной трубки должны быть организованы в соответствующем порядке спереди назад. Следовательно, хордомезодермальная ткань крыши первичной кишки индуцирует не только нервную трубку в целом, но также и ее специфические отделы. Эта региональная специфичность индукции была обнаружена Отто Мангольдом

¹ Гильда Прэншольдт-Мангольд трагически погибла при взрыве бензина в нагревательном приборе. Она прожила всего 26 лет, и статья ее была только что опубликована. Опыт, который лег в основу ее кандидатской диссертации, был одним из очень немногих в биологии, имевших прямое отношение к присуждению Нобелевской премии. Более подробные сведения о жизни этого замечательного человека и ее времени можно найти в статье Гамбургера (Hamburger, 1984).

¹ Этот классический термин стал источником путаницы, поскольку индукция нервной трубки хордой больше не считается первым индукционным влиянием у зародыша. Позже мы обсудим индукционные события, предшествующие этой «первичной» индукции.

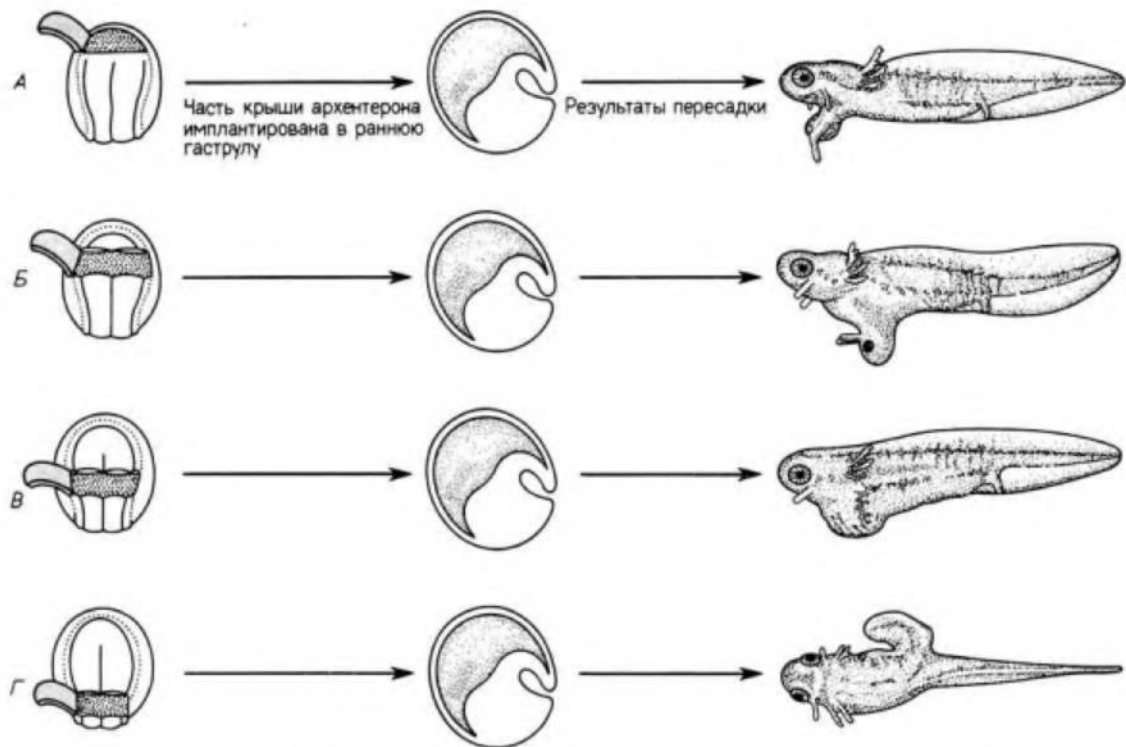


Рис. 8.16. Региональная специфичность индукции может быть обнаружена посредством имплантации различных участков крыши архентерона (обозначены темно-серым цветом) в бластоцель зародыша обыкновенного тритона на стадии ранней гастролы. У животных-хозяев сформировались различные дополнительные структуры. А. Голова с балансами. Б. Голова с балансами, глазами и передним мозгом. В. Задняя часть головы, задний мозг и слуховые пузырьки. Г. Туловищно-хвостовые структуры. (По Mangold, 1933.)

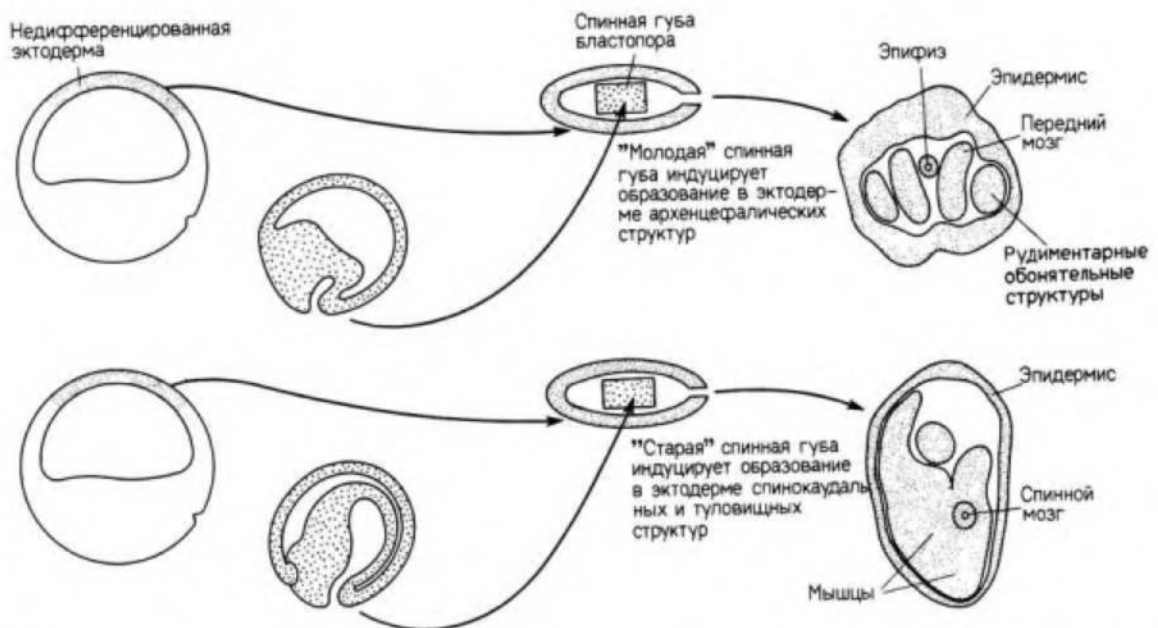


Рис. 8.17. Методика «сэндвичей», разработанная Гольцфретером. Участки спинной губы бластопора, взятые на стадии ранней («молодые») и поздней («старые») гастролы, помещены между двумя слоями эктодермы ранней гастролы. Возраст спинной губы бластопора определяет специфичность индуцируемых структур.

(Mangold, 1933) в серии изящных экспериментов, в которых участки крыши архентерона, взятые на стадии ранней нейрулы тритона, имплантировали в бластоцель ранней гаструлы тритона (рис. 8.16). У зародышей, только что завершивших гаструляцию, после удаления нервной пластинки из лежащей под ней крыши первичной кишки были вырезаны четыре последовательных участка. Эти участки по отдельности имплантировали в бластоцель зародышам на стадии ранней гаструлы. Самая передняя часть крыши первичной кишки индуцировала образование балансов и частей ротового аппарата (рис. 8.16, А); следующая за ней передняя часть индуцировала различные структуры головы, в том числе нос, глаза, балансы и слуховые пузырьки (органы слуха) (рис. 8.16, Б). Третий участок индуцировал только слуховые пузырьки (рис. 8.16, В), а самый задний участок — дорсальную туловищную и хвостовую мезодерму (рис. 8.16, Г). (Индукция задним концом хорды дорсальной мезодермы, а не дорсальной эктодермы нервной системы была подтверждена Биджтелем (Bijtel, 1931) и Споффордом (Spofford, 1945), которые показали, что из задней 1/5 части нервной пластинки происходят хвостовые сомиты и задний отдел протока пронефроса.)

Продолжая изучение феномена индукции, Гольтфретер (Holtfreter, 1936) изготовил «сэндвичи» из материала спинной губы бластопора, который поместил между двумя лоскутами недифференцированной эктодермы и культивировал их *in vitro* (рис. 8.17). Губа бластопора, взятая на стадии ранней гаструлы, индуцировала главным образом архенцефалические структуры, тогда как материал спинной губы бластопора, взятый на все более поздних стадиях, вызывал дифференцировку все более задних нейральных структур. Существует гипотеза, что региональная спецификация обусловлена действием двух веществ, секретируемых клетками хордомезодермы. Высокая концентрация одного из этих веществ обуславливает развитие переднего мозга, тогда как высокая концентрация другого индуцирует формирование спинного мозга и туловищных структур. Смесь этих двух веществ приводит к образованию среднего и заднего мозга.

Данные, подтверждающие эту модель, были получены в исследованиях с использованием искусственных тканеспецифических индукторов. Было обнаружено, например, что костный мозг морской свинки индуцирует образование только мезодермальных структур. Однако печень морской свинки может индуцировать развитие только структур переднего мозга. Тойвонен и Саксен (Toivonen, Saxén, 1955) имплантировали оба этих индуктора в бластоцель одного и того же зародыша на стадии ранней гаструлы. И если одна печень индуцировала

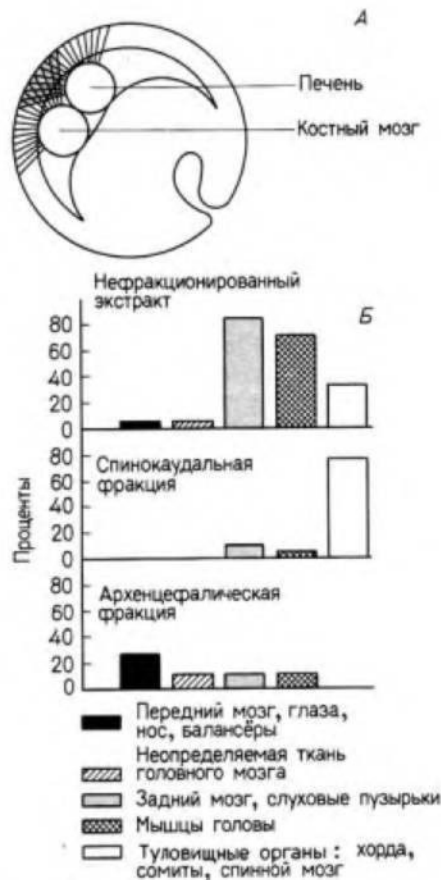


Рис. 8.18. Данные, свидетельствующие о существовании двойного градиента индукторов в крыше архентерона. А. Одновременная имплантация архенцефалического индуктора (печень морской свинки) и мезодермального индуктора (костный мозг морской свинки) в раннюю гаструлу тритона приводит к образованию всех отделов головного мозга и сомитов. Б. Разделение экстракта куриного зародыша, обладающего свойствами дейтерэнцефалического индуктора на фракцию, индуцирующую архенцефалические структуры, и на фракцию со свойствами спиналоудального индуктора. (По Toivonen, Saxén, 1955; Tiedmann et al, 1963.)

только передний мозг, а костный мозг — только мезодерму, то оба вместе индуцировали нормальные передний, задний и спинной мозг и туловищную мезодерму. Таким образом, первичная нейральная индукция может также быть обусловлена двойным градиентом (рис. 8.18). В дальнейшем были получены данные, свидетельствующие о правильности модели двойного градиента: из экстракта куриного зародыша, способного индуцировать преимущественно структуры заднего мозга, выделили препараты, обладающие способностью индуцировать передний мозг и туловищные структуры (Tiedmann, 1967). Когда вещество, индуцирующее задний мозг,

фракционировали на колонке, получали два активных начала: одно – индуцировавшее мезодермальные структуры, и другое – индуцировавшее передний мозг (рис. 8.18, Б).

Механизмы первичной эмбриональной индукции

Первичная эмбриональная индукция включает в себя по крайней мере три основных процесса. Во-первых, это индукция вегетативными клетками специфических различий в мезодерме. Дорсальные вегетативные клетки индуцируют лежащие над ними дорсальные краевые клетки к образованию хорды и сомитов (как это описано в гл. 4), тогда как другие вегетативные клетки индуцируют вентральные краевые клетки к образованию других мезодермальных структур. Индуцирующая способность дорсальной мезодермы (хорды), по-видимому, активируется лежащими под ней клетками энтодермы, потому что пересадка дорсальных вегетативных клеток облученным ультрафиолетом зародышам предотвращает эффект облучения; без этих клеток у зародышей не формируются осевые структуры. Следовательно, существует индукция, предшествующая «первичной» эмбриональной индукции. Во-вторых, происходит индукция нейральных клеток инволютирующими хордомезодермальными клетками. Этот тип индукции обнаружили Шпеман и Г. Мангольд. В-третьих, индукция, ответственная за возникновение региональной специфичности в нервной трубке. Этот тип индукции был описан О. Мангольдом. Современные данные подтверждают, что из вегетативной энтодермы в клетки краевой зоны зародыша постепенно поступает индуктивная информация и что в полярности эктодермы отражается региональная специфичность хордомезодермы, которая индуцирована вегетативной энтодермой, подстилающей хордомезодерму.

Индукция мезодермальной специфичности энтодермой

Ньюкоп (Nieuwkoop, 1969, 1973, 1977) выявил значение вегетативной энтодермы для индукции. Удаляя экваториальные клетки у зародыша на стадии бластулы, он показал, что ни анимальная, ни вегетативная шапочка по отдельности не образуют мезодермальные ткани. Однако, когда эти две шапочки соединяли одну с другой, клетки анимальной шапочки оказывались индуцированными к образованию мезодермальных структур, таких, как хорда, мышцы, пронефросы и клетки крови. Кроме того, полярность этой индукции (будет ли область анимальных клеток формировать хорду или мышцы и т. п.) зависела от дорсовентральной полярности

энтодермальной шапочки. В сходной серии опытов было показано (Nakamura, Takasaki, 1970), что эксплантаты из экваториальной области зародыша, взятые на стадии средней бластулы (участки, удаляемые в опытах Ньюкопа), были способны формировать мезодерму при культивировании *in vitro*. Эксплантаты из той же области, взятые на стадии 32 или 64 клеток, не могли формировать мезодермы и давали начало реснитчатым эктодермальным клеткам. Результаты этих опытов позволили предположить, что 1) клетки презумптивной мезодермы не детерминированы изначально, но достигают своего проспективного значения путем прогрессивного взаимодействия между анимальными и вегетативными клетками и 2) что клетки-предшественники экваториальных клеток становятся детерминированными к образованию мезодермы до начала гаструляции.

В середине восьмидесятых годов гипотеза нашла свое подтверждение и более глубокую трактовку в работах Гимлиха и Герхарта (Gimlich, Gerhart, 1984; см. также гл. 4). Когда лежащую наиболее дорсально вегетативную клетку зародыша шпорцевой лягушки, находящегося на стадии 64 клеток, пересаживали другому такому же зародышу, она индуцировала образование мезодермы. Сами эти вегетативные клетки формировали энтодермальные структуры, тогда как индуцированная мезодерма возникала из клеток хозяина. Можно видеть, что этот опыт (схему которого см. на рис. 4.20) аналогичен опыту Шпемана и Мангольда. Но если Шпеман и Мангольд получили две осевые структуры у хозяина, трансплантируя клетки дорсальной краевой зоны (ДКЗ), то Гимлих и Герhart получили тот же результат, трансплантируя наиболее дорсальные вегетативные клетки, т. е. клетки, находящиеся ниже ДКЗ. Кроме того, Гимлих показал (Gimlich, 1985, 1986), что клетки презумптивной хордомезодермы у 32-клеточного зародыша (т. е. клетки дорсальной краевой зоны, но не их вентральные или латеральные экваториальные двойники) способны индуцировать образование осевых структур. Эти трансплантаты ДКЗ также индуцировали соседние клетки хозяина к формированию осевых структур, включая сомиты и клетки ЦНС (рис. 8.19). Отсюда, по-видимому, следует, что бластомеры дорсальной краевой зоны обладают частичной автономией и что их судьба детерминируется относительно рано (Gimlich, 1985, 1986)¹. Частота, с которой эти транс-

¹ Описание «частичной автономии» указывает на частичный характер этого явления, поскольку полный хордомезодермальный фенотип не всегда продуцируется трансплантатами ДКЗ, взятыми со стадии 32 клеток. Так, например, даже если 92% хозяев имеют явные мезодермальные структуры, то только у 19% из них хордомезодерма образована тканями хозяина.

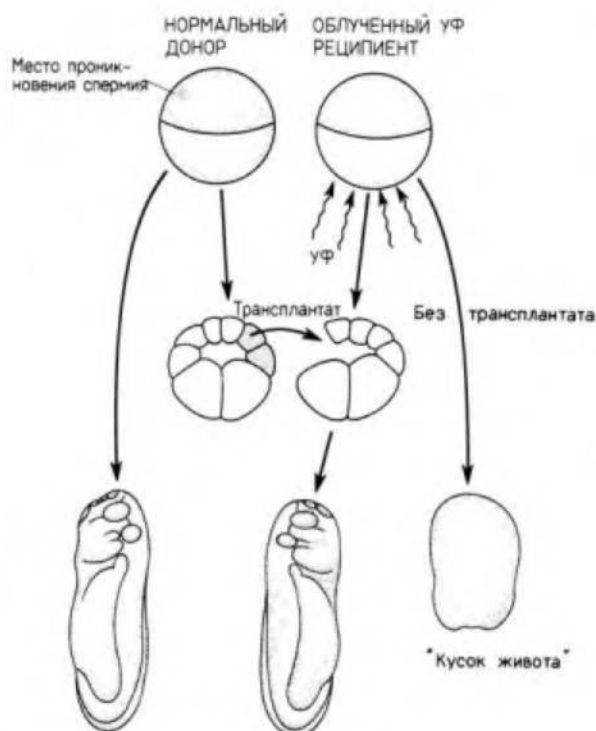


Рис. 8.19. Схематическое изображение результатов опытов по пересадке дорсальных краевых клеток от нормальных зародышей на стадии 32 бластомеров таким же зародышам, облученным УФ; без пересадки у облученных зародышей не происходит гаструляции, и из них формируются лишь «куски живота». Если облученным зародышам пересадить дорсальные краевые клетки, то они будут индуцировать формирование мезодермы, которая в свою очередь индуцирует образование осевых структур; в результате развивается нормальный головастик. (По Gimlich, 1986.)

плантаты ДКЗ могут индуцировать образование полного набора осевых структур в облученных зародышах-хозяевах, вначале очень низкая и увеличивается с возрастом зародышей-доноров. Напротив, способность дорсальных вегетативных клеток индуцировать мезодерму в течение этого периода снижается (Gimlich, 1985; Boterenbrood, Nieuwkoop, 1973). По-видимому, клетки дорсального вегетативного квадранта каким-то образом активируют (или продуцируют) факторы в клетках ДКЗ и окончательный фенотип «индуктивной мезодермы» развивается постепенно по мере того, как вегетативные клетки оказывают влияние на клетки краевой зоны, лежащие над ними.

Вентральные и боковые вегетативные клетки также играют определенную роль в спецификации мезодермы. Если наиболее дорсальные вегетативные клетки специфицируют осевые компоненты мезодермы (хорду и сомиты), то остальные веге-

тативные клетки детерминируют промежуточные (мышцы, мезенхима) и вентральные (мезенхима, кровь, пронефросы) мезодермальные структуры. Об этом свидетельствуют опыты по рекомбинации, результаты которых представлены в форме иллюстрированной таблицы на рис. 8.20 (Dale, Slack, 1987). Четыре вегетативных бластомера, взятых у 32-клеточного зародыша *Xenopus*, по отдельности соединяли с самым верхним ярусом клеток, взятым у меченного флуоресцеином зародыша ранней стадии. Как и ожидалось, наиболее дорсальная вегетативная клетка индуцировала в клетках анимального полюса образование дорсальных мезодермальных структур. Остальные вегетативные клетки обычно индуцировали в анимальных клетках образование либо промежуточных, либо вентральных мезодермальных структур. Эти опыты свидетельствуют о наличии двух четко различающихся индукционных процессов (один — в наиболее дорсальных вегетативных клетках, индуцирующих дорсальные краевые клетки, и другой — в остальных вегетативных клетках, индуцирующих промежуточную и вентральную мезодерму). Однако они не объясняют, чем процесс индукции промежуточных мезодермальных структур отличается от процесса индукции вентральных мезодермальных структур. Кроме того, данные этих авторов не вполне соответствуют карте презумптивных зачатков зародыша *Xenopus*, согласно которой большая часть промежуточных мезодермальных тканей происходит из вентральных краевых клеток.

Дейл и Слэк (Dale, Slack, 1987) считают, что такое несоответствие можно объяснить действием третьего индуктивного сигнала, исходящего от дорсальных краевых клеток, который «дорсализирует» прилежащие к ним краевые клетки. Изолированные вентральные краевые клетки способны образовывать в основном вентральные мезодермальные структуры. Если же эти клетки культивируют вместе с дорсальными краевыми клетками, то они образуют промежуточную мезодермальную ткань. Таким образом, имеются данные о трехступенчатой спецификации мезодермы (рис. 8.21): 1) индукция дорсальной мезодермы наиболее дорсальными вегетативными клетками; 2) индукция вентральной мезодермы другими вегетативными клетками; 3) дорсализация вентральных краевых клеток, прилежащих к дорсальным краевым клеткам, приводящая к образованию промежуточной мезодермы.

Влияние индукции на активность генов

Согласно приведенной выше модели, эктодерма и энтодерма специфицируются как таковые автономно. Лишь мезодерма приобретает свой статус путем индукции. Эта модель появилась на свет

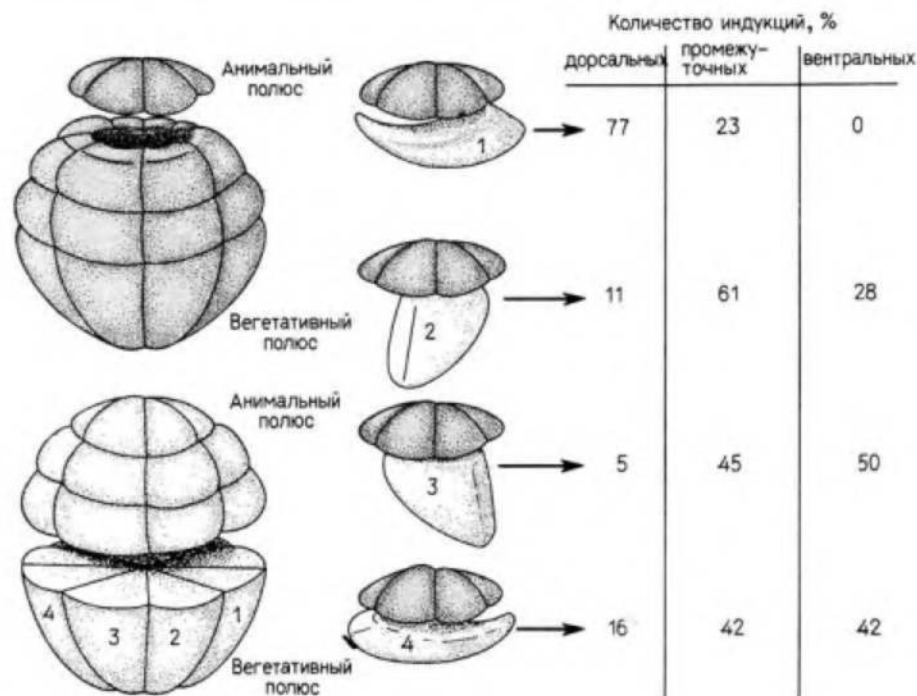


Рис. 8.20. Региональная специфичность индукции мезодермы, выявляемая рекомбинацией клеток 32-клеточного зародыша *Xenopus*. Клетки анимального полюса комбинировали с изолированными вегетативными бластомерами, взятыми по отдельности. Для идентификации клеток анимального полюса их метили флуоресцеином. Данные о специфичности индуцированных структур, возникших при таких рекомбинациях, суммированы справа. (По Dale, Slack, 1987.)

благодаря недавним исследованиям, в которых удалось идентифицировать клеточные РНК (такие методики будут изложены подробнее в гл. 10). Сарджент и др. (Sargent et al., 1986) диссоциировали ранние бластулы шпорцевой лягушки (от 32- до 128-клеточной стадии) на составляющие их клетки, удаляя оболочку оплодотворения и помещая зародышей в культуральную среду, не содержащую ионов Са и Mg. Они решили выяснить, будут ли эти диспергированные клетки по прошествии соответствующего времени синтезировать мРНК, специфичные для данного зародышевого листка. Результаты исследований показали, что гены, специфичные для энтодермы (для синтеза специфического белка кишечника) и для эктодермы (для синтеза определенного белка цитоскелета), активируются и с них транскрибируются новые мРНК даже в диспергированных клетках. Это открытие позволило предположить, что клетки энтодермы регулируются автономно содержащимися в них цитоплазматическими факторами. Однако гены, специфические для мезодермы (гены α -актина), не активируются в изолированных клетках. Когда зародышей диссоциировали даже на 128-клеточной стадии, в потомках диссоциированных клеток не удалось обнаружить мРНК

α -актина. Но этот ген можно было активировать, если клеткам давали возможность формировать скопления и таким образом взаимодействовать между собой. Отсюда следует, что экспрессия генов мезодермы требует, по-видимому, взаимодействия по меньшей мере двух типов клеток.

Наблюдения Ньюкопа были также подтверждены Гёрдоном и др. (Gurdon et al., 1985). Если морфологические исследования Ньюкопа правильны, то вегетативные клетки, помещенные непосредственно под клетки анимального полушария (которые в норме дают эктодермальные ткани), должны индуцировать в них активность α -актинового гена. У зародыша на стадии средней бластулы Гёрдон и его коллеги отрезали клетки краевой зоны и рекомбинировали клетки анимального полюса с массой вегетативных клеток (рис. 8.22). Они обнаружили, что в клетках анимального полюса началась транскрипция специфичной для мезодермы мРНК α -актина. Вегетативные клетки индуцировали включение специфического для мезодермы гена в презумптивной эктодермальной ткани. Одновременно эти взаимодействия вызвали утрату специфической активности эктодермальных генов (Sargent et al., 1986).

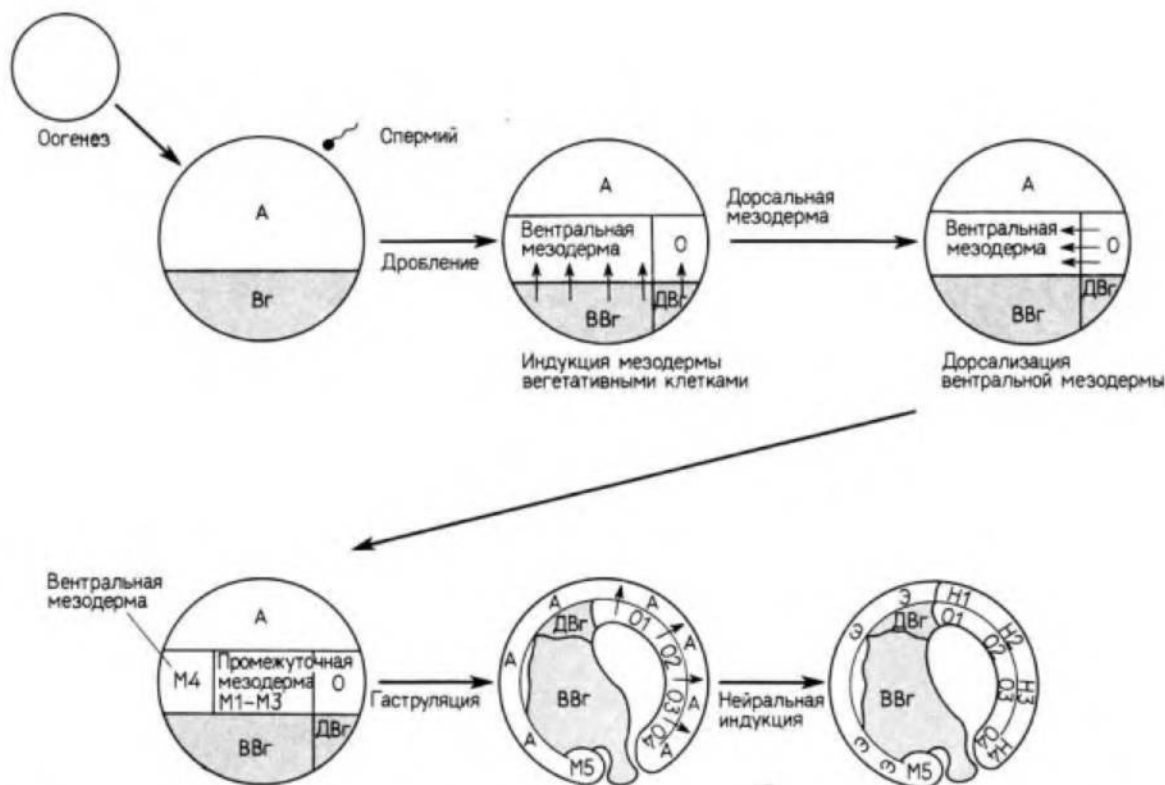


Рис. 8.21. Схема, иллюстрирующая индукционные взаимодействия в раннем развитии *Xenopus*. В период оогенеза возникает анимально-вегетативная полярность. После оплодотворения происходит перераспределение цитоплазмы, которое подразделяет вегетативную область на дорсо-вегетативную (ДВг) и вентро-вегетативную (ВВг) области. В период дробления осуществляется индукция мезодермы: ДВг-область индуцирует в лежащих над ней дорсальных краевых клетках активность организатора (О), тогда как ВВг-область индуцирует осевую мезодерму (М). Полярность этой мезодермы (М1, М2, М3, М4) является отражением полярности подстилающих ее вентральных клеток. В период гаструляции вентральная и боковая мезодерма перемещаются по сторонам зародыша (на рисунке не показаны), а дорсальная мезодерма распространяется (О1, О2, О3, О4) и индуцирует лежащие над ней эктодермальные клетки. Эта индукция побуждает эктодермальные клетки к превращению в нейральные клетки (Н1, Н2, Н3, Н4). Таким образом, полярность энтодермы передается нейральной ткани. Неиндуцированная эктодерма (А) становится эпидермисом (Э). (По Smith et al., 1985.)

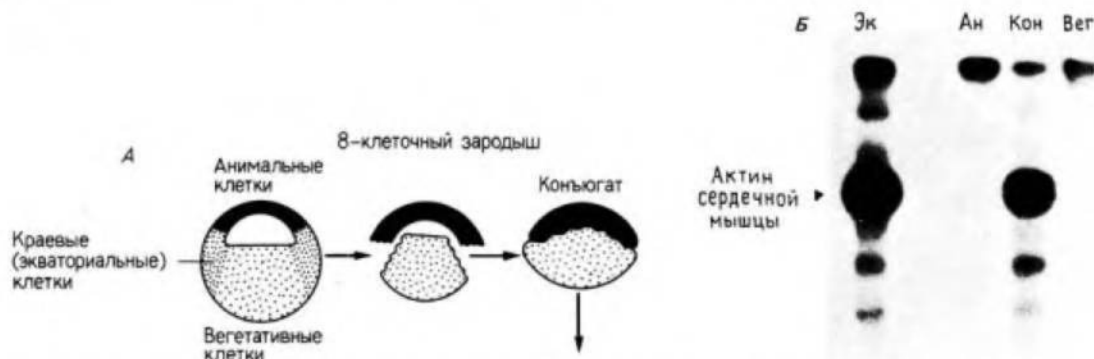


Рис. 8.22. Опыты анимально-вегетативной рекомбинации. А. У зародышей на стадии 8 бластомеров удаляли краевые (экваториальные) клетки и приводили в контакт анимальные и вегетативные клетки. Б. Специфический для мышц актин был обнаружен в краевой (экваториальной) области и в рекомбинированных анимальных и вегетативных клетках, но не в анимальных и вегетативных клетках, культивируемых по отдельности. Помимо этого меченный радиоактивной меткой фрагмент специфичного для мышц актинового гена гибридизировали с мРНК этого гена (если она присутствовала). Затем добавляли нуклеазу, которая должна была разрушить любую одноцепочную ДНК, но оставить ДНК-РНК-гибриды. Полученные ДНК-РНК-гибриды были подвергнуты электрофорезу в полиакриламидном геле и определены с помощью радиоавтографии. Радиоактивный фрагмент гена был защищен от переваривания только в тех случаях, когда присутствовала специфичная для мышц актиновая мРНК. (По Gurdon et al., 1985; фотография с любезного разрешения J. Gurdon.)

Поиски индукторов мезодермы

Предполагается, как это следует из рис. 8.21, что в индукции мезодермы участвуют три фактора (или три комплекса факторов). Два фактора (исходящие из дорсальных вегетативных клеток и из вентральных вегетативных клеток) индуцируют формирование кольца мезодермы, содержащего область организатора (т.е. клеток, лежащих над дорсальными вегетативными клетками). Организатор затем синтезирует другой фактор, регионально индуцирующий специфические мезодермальные структуры (такие, как хорда и сомиты, лежащие на дорсальной стороне, и клетки крови, локализирующиеся на периферии). Эти факторы еще не идентифицированы, однако результаты недавних исследований показали, что они могут быть идентичными или очень сходными с факторами роста, которые известны как регуляторы пролиферации клеток у млекопитающих (и которые будут обсуждаться в гл. 20). Фактор, вырабатываемый вентральными вегетативными клетками, по-видимому, сходен с фактором роста фибробластов (ФРФ). Сравнительно недавно было показано (Slack et al., 1987), что клетки анимального полушария зародышей шпорцевой лягушки на стадии средней бластулы (1024–2048 клеток), подвергнутые воздействию ФРФ в слабых концентрациях, формируют мезодермальные ткани, такие, как клетки крови и мезенхиму. Кроме того, подобно ФРФ, естественный мезодермальный индуктор специфически связывается с полисахаридом гепарином. (Об этом свидетельствует тот факт, что гепарин подавляет индукцию мезодермы в клетках анимального полушария, когда эти клетки культивируют вместе с вегетативными клетками.) Затем было обнаружено (Kimelman, Kirschner, 1987), что инкубация клеток *Xenopus*, взятых из области анимального полюса, в присутствии ФРФ приводит к транскрипции специфических для мезодермы актиновых генов. Таким образом, представляется вероятным, что у зародышей лягушек какой-то белок, очень сходный с ФРФ, ответствен за индукцию вентральной мезодермы.

Фактор, ответственный за образование дорсальной мезодермы (хорды и осевой мускулатуры), по-видимому, представляет собой белок с молекулярной массой 16 000 дальтон, который секретируется клоном клеток линии ХТС из головастиков *Xenopus* (Smith, 1987). Когда клетки анимального полушария зародышей *Xenopus* на стадии средней бластулы помещали в среду, в которой росли клетки линии ХТС (и секретиروвали в нее белки), то клетки *Xenopus* давали начало хорде и мышцам (но из них не возникали клетки крови и лишь изредка развивались почки) (рис. 8.23). Один из факторов, секретируемых клетками ХТС, возможно, аналогичен трансформирующему фактору роста $\beta 2$ (ТФР- $\beta 2$). Во-первых, продукты, секретируемые клетками ХТС в опытах с количественным анализом роста, способны действовать подобно ТФР- $\beta 2$. Во-вторых, один ТФР- $\beta 2$ оказался мощным активатором специфичного для мезодермы α -актинового гена в клетках анимальной шапочки. В-третьих, антитела к ТФР- $\beta 2$ блокировали 80% индукций мезодермальных структур в клетках анимальной шапочки, помещенных в кондиционированную ХТС среду (Rosa et al., 1988).

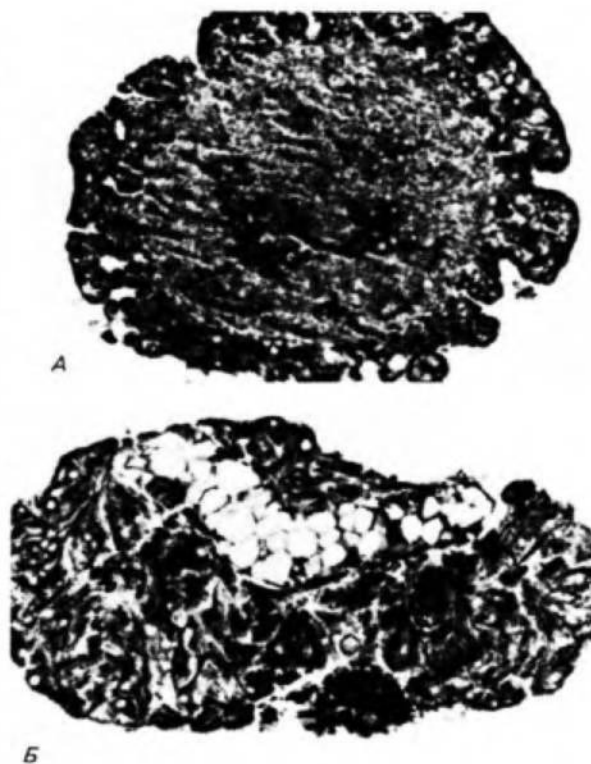


Рис. 8.23. Влияние «мезодермализующего фактора» на клетки анимального полюса зародыша *Xenopus*. А. Срез через участок ткани из клеток анимального полюса, взятых на стадии бластулы и культивировавшихся в течение 3 сут. Сформировался «атипичный эпидермис». Б. Срез через ткань из клеток анимального полюса, инкубированных в присутствии дорсального мезодермализующего фактора. Можно идентифицировать хорду и мышцы. (Из Smith et al., 1985.)

Этот ТФР- $\beta 2$ -подобный фактор, вероятно, является продуктом гена *Vg1*, мРНК которого локализована в вегетативной части яйца *Xenopus* (см. рис. 7.9). В развивающемся зародыше эта мРНК обнаруживается исключительно в энтодерме. Белок, который кодирует эта мРНК, напоминает белок ТФР и секретируется вегетативными клетками (Weeks, Melton, 1987). Возможно, что взаимодей-

ствия между этими ФРФ-подобными и ТФР- β 2-подобными факторами ответственны за генерирование региональной специфичности мезодермальных индукторов. ФРФ усиливает способность ТФР- β 2 к индукции мезодермы, а смесь ТФР- β -факторов, по-видимому, усиливает способность ФРФ к индукции мезодермы (Kimelman, Kirschner, 1987; Rosa et al., 1988).

Не исключено, что дорсализирующий фактор (или факторы) присутствует во всех вегетативных клетках, но только в вегетативных клетках, занимающих наиболее дорсальное положение, он может экспрессироваться. Было обнаружено (Kao et al., 1986), что микроинъекция ионов лития в клетки любого вегетативного слоя, облученного ультрафиолетом 32-клеточного зародыша, приводит к образованию из него нормальной личинки с дорсо-вентральной полярностью. Инъекция лития в любую вентральную вегетативную клетку *необлученного* 32-клеточного зародыша приводит к возникновению головастика с двумя головами. По-видимому, все вегетативные клетки могут обладать потенциальной «дорсализирующей информацией», но для ее реализации необходима некоторая активация этого материала.

Нейральный индуктор как молекула, способная к диффузии

Перейдем теперь к стадии, на которой хордомезодерма индуцирует образование нервной трубки (т. е. к тому, что Шпеман называл первичной индукцией). Хотя Шпеман считал поиски молекулы-организатора, мягко говоря, глупостью, его ученики упорно стремились вперед. Они пришли к выводу, что идентификация активного индуктора является нелегкой задачей. Проблема заключалась в отсутствии специфичности; оказалось, что огромное число самых разных веществ могут индуцировать нервную пластинку. Среди веществ были терпентин, формальдегид и краситель метиленовый синий, а также фиксированный материал спинной губы и широкой ассортимент тканей взрослых организмов, относящихся к разным типам животных. Основываясь на таком эклектическом характере индукции, Гольтфретер (Holtfreter, 1948) предположил, что реальный индуктор может содержаться в самой эктодерме и высвобождаться из нее с помощью слабого цитолиза. Достаточным было любое воздействие, вызывающее такое сублетальное повреждение, например помещение эктодермы в слабощелочную или гипертоническую среду. Впоследствии эта гипотеза была изменена некоторыми авторами (Barth, Barth, 1969), предположившими, что различные вещества действуют, высвобождая из

клеток эктодермы ионы натрия, находящиеся в них в связанном состоянии. Молекула индуктора не выделена до сих пор, хотя получены данные, свидетельствующие о том, что нейтрализующий фактор в маскированной форме содержится в рибонуклеопротеидных частицах эктодермальных клеток (John et al., 1984).

Какое бы вещество ни было ответственным за индукцию, для нее не требуется физический контакт между эктодермой и хордомезодермой. Ниу и Твитти (Niu, Twitty, 1953) было показано, что фактор, вызывающий индукцию, способен к диффузии. Эти авторы культивировали губу бластопора или хордомезодерму в течение недели *in vitro*. Когда они удалили индуктор и поместили в такую кондиционированную среду эктодерму зародыша, она дифференцировалась в нейральные, пигментные и мезодермальные клетки. Преобладание того или иного типа клеток зависело от возраста индуктора. Хордомезодерма более ранних зародышей-доноров вызывала в большинстве случаев дифференцировку нейральных и пигментных клеток. В культуральной среде, не кондиционированной тканями индуктора, не наблюдалось ни нейральной, ни мезодермальной дифференцировки эктодермальных клеток. Следовательно, для осуществления индукции не нужен физический контакт между индуктором и реагирующей тканью. Сходные данные получил Тойвонен (Toivonen, 1979), поместив спинную губу бластопора и эктодермальную ткань на противоположные стороны мембранного фильтра с диаметром пор 0,5 мкм. И хотя в порах мембраны не было обнаружено отростков клеток, индукция имела место. Таким образом, подтвердились данные о том, что индукция может происходить без контакта между клетками.

Все еще ведутся споры относительно компонентов и механизма первичной эмбриональной индукции, одной из старейших проблем биологии развития. В одном обзоре, написанном в 1985 г. (Smith et al., 1985), авторы признаются: «Нельзя не согласиться с тем, что мы в самом деле ничего не знаем о биохимических основах индукционных взаимодействий». Обсуждая эту проблему в 1927 г., Шпеман заметил: «То, что достигнуто, — это лишь первый шаг. Мы стоим перед загадками, но не без надежды решить их. А загадки с надеждой на их решение — чего еще больше может желать ученый?» Брошенный Шпеманом вызов все еще остается в силе.

Компетенция и вторичная индукция

Каждая система эмбриональной индукции состоит по меньшей мере из двух компонентов: из ткани, способной синтезировать индуцирующие



Рис. 8.24. Каскад вторичных индукций в процессе развития глаза.

стимулы, и ткани, способной воспринимать эти стимулы и реагировать на них. До сих пор мы рассматривали специфичность стимулов; теперь мы обратимся к специфичности реагирующих клеток. Способность отвечать специфическим образом на данный стимул называется **компетентией**. Мы уже видели, что на стадии ранней гастрюлы имплантированная спинная губа бластопора может индуцировать нервную пластинку и осевые структуры почти в любом месте зародыша, где имеется эктодерма. Однако с возрастом эктодерма зародыша теряет способность реагировать на воздействие, и имплантация спинной губы бластопора под презумптивный эпидермис на стадии нейрулы не приводит к формированию у зародыша новой нервной пластинки.

Итак, эктодермальный эпителий поздней нейрулы более не компетентен реагировать на воздействие хордомезодермы, однако он становится компетентным к реакции на новые индукторы. Например, на контакт с глазным пузырем (происходящим из переднего мозга) он отвечает образованием хрусталика. Сходным образом задний мозг может индуцировать в прилегающей к нему области эпителия образование слуховых пузырьков. Следовательно, эктодермальный эпителий приобрел способность отвечать на стимулы, получаемые от **вторичных индукторов**.

Будет полезно рассмотреть здесь одну из схем этих вторичных индукций. (Такие индукции представляют собой наиболее важные события в развитии и будут подробно обсуждаться в гл. 16.) Если бы Шпеман никогда не выполнил описанных выше опытов, открывших явление первичной эмбриональной индукции, ему все равно была бы обеспечена слава благодаря проведенному им анализу тканевых взаимодействий в развитии глаза. Эти вторичные

индукции иллюстрирует рис. 8.24. Формирование хрусталика, как уже упоминалось, начинается, когда выпячивание переднего мозга (глазной пузырь) на стадиях от средней до поздней нейрулы вступает в контакт с лежащим над ним эпителием. В результате такого контакта передняя стенка глазного пузыря инвагинирует, образуя двуслойную нейральную структуру – глазную чашу. Глазной пузырь ответствен за индукцию хрусталиковой плакиды в лежащем над ним эпителии. Если между глазным пузырем и лежащим над ним эпителием поместить какую-либо преграду, то хрусталиковая плакода не формируется. Глазная чаша дифференцируется на пигментную и нейральную части сетчатки (ретины). Хрусталиковый пузырек представляет собой и индуцирующую, и реагирующую ткань. Он индуцирует в новом лежащем над ним эпителии образование роговицы, и вместе с тем он отвечает на индуцирующие стимулы нейральной сетчатки, дифференцируясь в definitivo хрусталик.

Таким образом, и при первичных, и при вторичных индукциях происходит прогрессивное ограничение потенций эктодермальных клеток. При первичных индукционных взаимодействиях изменения происходят в период гастрюляции; при вторичных индукционных взаимодействиях детерминация наступает позже. И в этих случаях мы снова видим, что детерминация зависит от взаимодействия между группами клеток.

В этой и в предыдущей главах мы обсуждали механизмы детерминации эмбриональных клеток. Мы видели, что имеются два главных способа, с помощью которых осуществляется детерминация. Первый способ состоит в распределении морфогенетических детерминантов по специфическим клеткам и последующей детерминации этих клеток в зависимости от того, какая область цитоплазмы

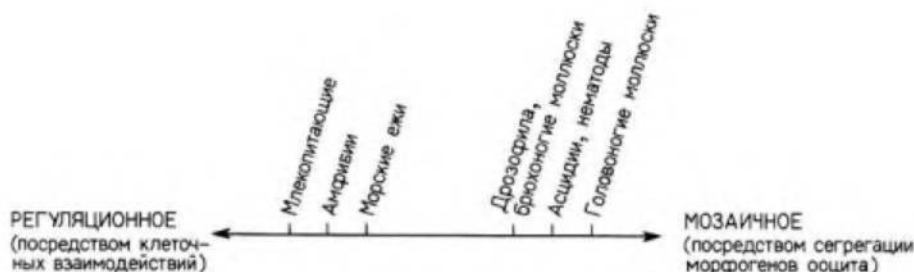


Рис. 8.25. Непрерывность ряда от зародышей с резко выраженной мозаичностью развития (моллюски, нематоды) до зародышей, характеризующихся преимущественно регуляционным типом развития (млекопитающие, амфибии). У всех животных в той или иной степени используются оба механизма. (По диаграмме D. Kirk, личное сообщение.)

зиготы включена в них. Каждая такая клетка будет дифференцироваться автономно, независимо от окружающих ее клеток. Организмы, в развитии которых превалирует этот способ детерминации, следуют по пути мозаичного развития. Второй способ детерминации включает в себя взаимодействие клеток на более поздних стадиях развития. Клетки развиваются соответственно своему положению в зародыше. Зародыши, чьи клетки первоначально детерминируются таким способом, следуют по регуляционному типу развития. Так, любая клетка в наиболее анимальном слое раннего зародыша морского ежа будет в норме давать эктодермальное потомство, но если ее комбинировать с микромерами, то она может образовать ткань кишки, что характерно для энтодермы.

Очень важно помнить о том, что оба механизма используются в развитии любого конкретного организма и что имеется непрерывный ряд между мозаичным и регуляционным типами развития (рис. 8.25). У животных с мозаичным типом развития, таких, как оболочники и улитки, некоторые ткани образуются в результате регуляционных взаимодействий, а у животных с регуляционным типом развития, таких, как лягушки, имеются области цитоплазмы, содержащие морфогенетические детерминанты (например, полярные гранулы). Следует подчеркнуть, что как мозаичный, так и регуляционный способы детерминации могут быть прослежены в обратном направлении до гетерогенно расположенных материалов в цитоплазме зиготы. Механизмы, которые обуславливают локализацию в цитоплазме определенных клеток особых молекул, влияющих на экспрессию генов, до сих пор неизвестны.

ЛИТЕРАТУРА

- Barth L. G., Barth L. J. (1969). The sodium dependence of embryonic induction. *Dev. Biol.* **20**, 236–262.
- Bijtel J. H. (1931). Über die Entwicklung der Schwanzes bei Amphibien. *Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org.* **125**, 448–486.
- Bonnet C. (1764). *Contemplation de la Nature*. Marc-Michel Ray, Amsterdam.
- Boterenbrood E. C., Nieuwkoop P. D. (1973). The formation of the mesoderm in urodelean amphibians. V. Its regional induction by the endoderm. *Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org.* **173**, 319–332.
- Brenner S. (1979). Cited in H. F. Judson (1979). *The Eighth Day of Creation*. Simon and Schuster, New York, p. 219.
- Cassirer E. (1950). Developmental mechanics and the problem of cause in biology. In E. Cassirer (ed.), *The Problem of Knowledge*. Yale University Press, New Haven.
- Czihak G. (1971). Echinoids. In: G. Reverberi (ed.), *Experimental Embryology of Marine and Freshwater Invertebrates*. Elsevier North-Holland, Amsterdam, pp. 363–506.
- Dale L., Slack J. M. W. (1987). Regional specificity within the mesoderm of early embryos of *Xenopus laevis*. *Development* **100**, 279–295.
- Driesch H. (1892). The potency of the first two cleavage cells in echinoderm development. Experimental production of partial and double formations. In: B. H. Willer and J. M. Oppenheimer (eds.), *Foundations of Experimental Embryology*. Hafner, New York.
- Driesch H. (1893). Zur Verlagerung der Blastomeren des Echinodermes. *Anat. Anz.* **8**, 348–357.
- Driesch H. (1894). *Analytische Theorie der organischen Entwicklung*. W. Engelmann, Leipzig.
- Gimlich R. L. (1985). Cytoplasmic localization and chordamesoderm induction in the frog embryo. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **89** [Suppl.], 89–111.
- Gimlich R. L. (1986). Acquisition of developmental autonomy in the equatorial region of the *Xenopus* embryo. *Dev. Biol.* **116**, 340–352.
- Gimlich R. L., Cook J. (1983). Cell lineage and the induction of nervous systems in amphibian development. *Nature* **306**, 471–473.
- Gimlich R. L., Gerhart J. C. (1984). Early cellular interactions promote embryonic axis formation in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* **104**, 117–130.
- Gould S. J. (1977). *Ontogeny and Phylogeny*. Belknap Press, Cambridge, MA.
- Gurdon J. B., Fairman S., Mohun T. J., Brennan S. (1985b). The activation of muscle-specific actin genes in *Xenopus* development by an induction between animal and vegetal cells of a blastula. *Cell* **41**, 913–922.
- Hagstrom B. E., Lonning S. (1965). Studies in cleavage and development of isolated sea urchin blastomeres. *Sarsia* **18**, 1–9.
- Hamburger V. (1984). Hilde Mangold, co-discoverer of the organizer. *J. Hist. Biol.* **17**, 1–11.
- Holtfrete J. (1936). Regional induktionen in Xenoplastisch zusammengesetzten explantaten. *Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org.* **134**, 466–561.
- Holtfrete J. (1948). Concepts on the mechanism of embryonic

- induction and its relation to parthenogenesis and malignancy. Symp. Soc. Exp. Biol. **2**, 17–48.
- Hörstadius S. (1928). Über die Determination des Keimes bei Echinodermen. Acta Zool. **9**, 1–191.
- Hörstadius S. (1935). Über die Determination im Verlaufe der Eiasche bei Seeigeln. Pubbl. Stn. Zool. Napoli **14**, 251–479.
- Hörstadius S. (1939). The mechanics of sea urchin development studied by operative methods. Biol. Rev. **14**, 132–179.
- Hörstadius S., Wolsky A. (1936). Studien über die Determination der Bilateralsymmetrie des jungen Seeigelkeimes. Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org. **135**, 69–113.
- Huxley J.S., deBeer G.R. (1934). Elements of Experimental Embryology. Cambridge University Press, Cambridge.
- John M., Born J., Tiedemann H. and Tiedemann H. (1984). Activation of a neuralizing factor in amphibian ectoderm. Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org. **193**, 13–18.
- Jukes T. (1966). Molecules and Evolution. Columbia University Press, New York.
- Kao K. R., Masui Y., Elinson R. P. (1986). Lithium-induced respecification of pattern in *Xenopus laevis* embryos. Nature **322**, 371–373.
- Kimelman D., Kirschner M. (1987). Synergistic induction of mesoderm by FGF and TGF- β and the identification of an mRNA coding for FGF in the early *Xenopus* embryo. Cell **51**, 869–877.
- Kölreuter J. G. (1761–1766). Vorläufige Nachricht von einigen das Geschlecht der Pflanzen betreffenden Versuchen und Beobachtungen, nebst Fortsetzungen 1, 2, und 3. Leipzig.
- Lenoir T. (1980). Kant, Blumenbach, and vital materialism in German biology. Isis **71**, 77–108.
- Mangold O. (1933). Über die Induktionsfähigkeit der verschiedenen Bezirke der Neurula von Urodelen. Naturwissenschaften **21**, 761–766.
- McClendon J. F. (1910). The development of isolated blastomeres of the frog's egg. Am. J. Anat. **10**, 425–430.
- Morgan T. H. (1895). Studies on the "partial" larvae of *Sphaerichneumon*. Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org. **2**, 81–126.
- Nakamura O., Takasaki H. (1970). Further studies on the differentiation capacity of the dorsal marginal zone in the morula of *Triturus pyrrhogaster*. Proc. Japan Acad. **46**, 700–705.
- Nieuwkoop P. D. (1969). The formation of the mesoderm in urodele amphibians. I. Induction by the endoderm. Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org. **162**, 341–373.
- Nieuwkoop P. D. (1973). The "organisation center" of the amphibian embryo: Its origin, spatial organisation and morphogenetic action. Adv. Morphog. **10**, 1–39.
- Nieuwkoop P. D. (1977). Origin and establishment of embryonic polar axes in amphibian development. Curr. Top. Dev. Biol. **11**, 115–132.
- Niu M. C., Twitty V. C. (1953). The differentiation of gastrula ectoderm in medium conditioned by axial mesoderm. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **39**, 985–989.
- Okazaki K. (1975). Spicule formation by isolated micromeres of the sea urchin embryo. Am. Zool. **15**, 567–581.
- Recanzone G., Harris W. A. (1985). Demonstration of neural induction using nuclear markers in *Xenopus*. Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org. **194**, 344–354.
- Rosa F., Roberts A. B., Daneilpour D., Dart L. L., Sporn M. B., David I. B. (1988). Mesoderm induction in amphibians: The role of TGF- β -like factors. Science **239**, 783–785.
- Roux W. (1888). Contributions to the developmental mechanics of the embryo. On the artificial production of half-embryos by destruction of one of the first two blastomeres and the later development (postgeneration) of the missing half of the body. In: B. H. Willier and J. M. Oppenheimer (eds.), Foundations of Experimental Embryology. Hafner, New York, pp. 2–37.
- Runnstrom J. (1929). Über Selbstdifferenzierung und Induktion bei dem Seeigelkeim. Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org. **117**, 123–145.
- Sargent T. D., Jamrich M., David I. (1986). Cell interactions and the control of gene activity during early development of *Xenopus laevis*. Dev. Biol. **114**, 238–246.
- Saxén L., Toivonen S. (1962). Embryonic Induction. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
- Slack J. M. W., Darlington B. G., Heath J. K., Godsave S. F. (1987). Mesoderm induction in early *Xenopus* embryos by heparin-binding growth factor. Nature **326**, 197–200.
- Smith J. C. (1987). A mesoderm-inducing factor is produced from a *Xenopus* cell line. Development **99**, 3–14.
- Smith J. C., Dale L., Slack J. M. W. (1985). Cell lineage labels and region-specific markers in the analysis of inductive interactions. J. Embryol. Exp. Morphol. **89** [Suppl.], 317–331.
- Spemann H. (1918). Über die Determination der ersten Organanlagen des Amphibienembryo. Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org. **43**, 448–555.
- Spemann H. (1938). Embryonic Development and Induction. Yale University Press, New Haven.
- Spemann H., Mangold H. (1924). Induction of embryonic primordia by implantation of organizers from a different species. In: B. H. Willier and J. M. Oppenheimer (eds.), Foundations of Experimental Embryology. Hafner, New York, pp. 144–184.
- Spofford W. R. (1945). Observations on the posterior part of the neural plate in *Amblystoma*. J. Exp. Zool. **99**, 35–52.
- Thomson J. A. (1907). Heredity. Putnam, New York.
- Tiedemann H. (1967). Biochemical aspect of primary induction and determination. In: R. Weber (ed.), The Biochemistry of Animal Development, Vol. 2. Academic, New York, pp. 3–55.
- Tiedemann H., Becker U., Tiedemann H. (1963). Chromatographic separation of a hindbrain-inducing substance into mesodermal- and neural-inducing subfractions. Biochem. Biophys. Acta **74**, 557–560.
- Toivonen S. (1979). Transmission problems in primary induction. Differentiation **15**, 177–181.
- Toivonen S., Saxén L. (1955). The simultaneous inducing action of liver and bone marrow of the guinea pig in implantation and explantation experiments with embryos of *Triturus*. Exp. Cell. Res. [Suppl.] **3**, 346–357.
- Ubisch L. von (1919). Über die Determination der larvalen Organe und der Imaginalanlage bei Seeigeln. Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org. **117**, 80–122.
- Waddington C. H. (1933). Induction by the primitive streak and its derivatives in the chick. J. Exp. Biol. **10**, 38–46.
- Weeks D. L., Melton D. A. (1987). A maternal messenger RNA localized to the vegetal pole in *Xenopus* eggs codes for a growth factor related to TGF- β . Cell **51**, 861–867.
- Weismann A. (1892). Essays on Heredity and Kindred Biological Problems. Translated by E. B. Poulton, S. Schoenland and A. E. Shipley. Clarendon, Oxford.
- Weismann A. (1893). The Germ-Plasm: A Theory of Heredity. Translated by W. Newton Parker and H. Ronnfeld. Walter Scott, Ltd., London.
- Wilson E. B. (1896). The Cell in Development and Inheritance. Macmillan, New York.

Глава 9

Тождество геномов и дифференциальная экспрессия генов: эмбриологические исследования

Наследственность осуществляется путем передачи ядерной преформации, которая в ходе развития находит свое выражение в процессе цитоплазматического эпигенеза.

Э. Б. Вильсон (1925)¹

Две клетки дифференцированы по-разному, если, обладая одинаковым геномом, они синтезируют разные белки.

Ф. ЖАКОБ и Ж. МОНО (1963)

Введение

Генетика развития изучает проблему реализации наследственных потенций оплодотворенного яйца в течение жизни организма. Когда мы наблюдаем развитие зародыша, становится очевидным, что в клетках разных типов экспрессируются разные гены. Гемоглобин, например, характерен для эритроцитов, тогда как кристаллин обнаруживается только в клетках хрусталика глаза. Клетки сетчатки способны передавать электрические импульсы на большие расстояния, а прилежащие к ним клетки пигментного эпителия черны от гранул меланина и лишены способности проводить электричество. А между тем клетки каждого из типов образуются в результате митотических делений одного и того же оплодотворенного яйца, и, следовательно, ядра клеток каждого типа должны содержать одинаковую информацию. Развитие, таким образом, осуществляется посредством избирательного включения специфических генов в соответствующем месте и в соответствующее время. Отсюда рождается и проблема, которой занимается генетика развития: какие именно механизмы обуславливают такое избирательное включение, в результате которого возникают различия между клетками?

Центральная гипотеза генетики развития заключается в том, что дифференцировка клеток происхо-

дит без генетических изменений. Другими словами, предполагается, что в любом организме все соматические клетки содержат одинаковый набор генов. Следовательно, разные типы дифференцированных клеток должны использовать разные гены из этого общего для всех клеток наследственного материала. Данные, положенные в основу гипотезы **дифференциальной экспрессии генов**, получены как в генетических, так и эмбриологических исследованиях. В этой главе мы обсудим работы, посвященные вопросу о том, происходят ли в процессе развития необратимые изменения генома.

Тождество геномов

Некоторые крупные неделящиеся клетки личинок двукрылых (таких, как *Drosophila* и *Chironomus*) содержат **политенные (многонитчатые) хромосомы**. В этих хромосомах репликация ДНК происходит без последующего митоза, и поэтому они содержат 512, 1024 и даже больше двойных спиральных молекул ДНК вместо одной (рис. 9.1 и 9.2). Клетки с политенными хромосомами никогда не делятся. Эти хромосомы можно увидеть с помощью светового микроскопа и различить характерную для них исчерченность. У дрозофилы в гаплоидном наборе хромосом насчитывается примерно 5150 дисков. В некоторых тканях в политенных хромосомах видны широкие полосы, внутри которых после спе-

¹ Цит. по кн.: Э. Вильсон. Клетка и ее роль в развитии и наследственности. т. 2, с. 974. Изд-во АН СССР. М.-Л., 1940, 1062 с. Перевод с англ. В. А. Дорфмана и М. С. Навашина.

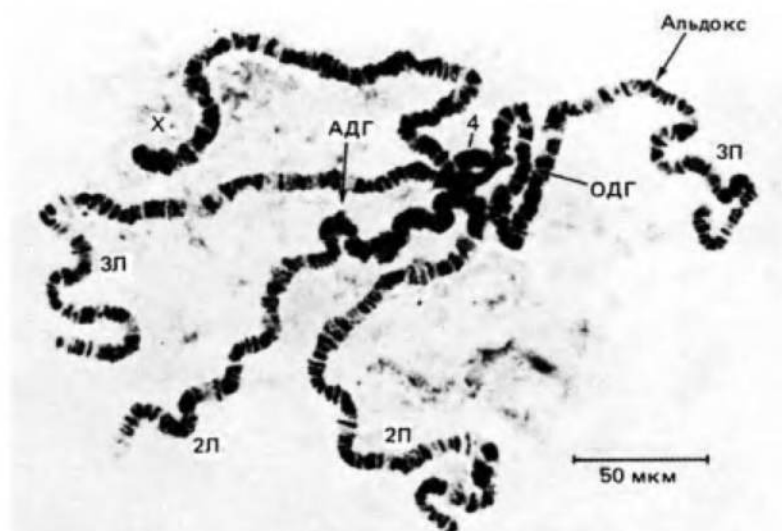


Рис. 9.1. Политенные хромосомы из клеток слюнных желез *Drosophila melanogaster*. Четыре хромосомы соединены в области центромер, формирующих плотный хромоцентр. На этих хромосомах картированы структурные гены для алкогольдегидрогеназы (АДГ), альдегидоксидазы (альдокс) и октанодегидрогеназы (ОДГ). X – половая хромосома; арабскими цифрами обозначены номера хромосом; Л – левое и П – правое плечо второй и третьей хромосом. (Из Ursprung et al., 1968; фотография с любезного разрешения Н. Ursprung.)

специальной обработки можно обнаружить два или более тонких дисков. В ряде генетических работ (Judd, Young, 1973) высказывалось предположение о наличии корреляции между числом этих дисков или **хромомер**, и числом генов у мухи

(Swanson et al., 1981). Число политенных хромосом и характер исчерченности на протяжении всего личиночного периода остаются неизменными (Beer-mann, 1952; рис. 9.3). При сравнении политенных хромосом в разных тканях личинки не было

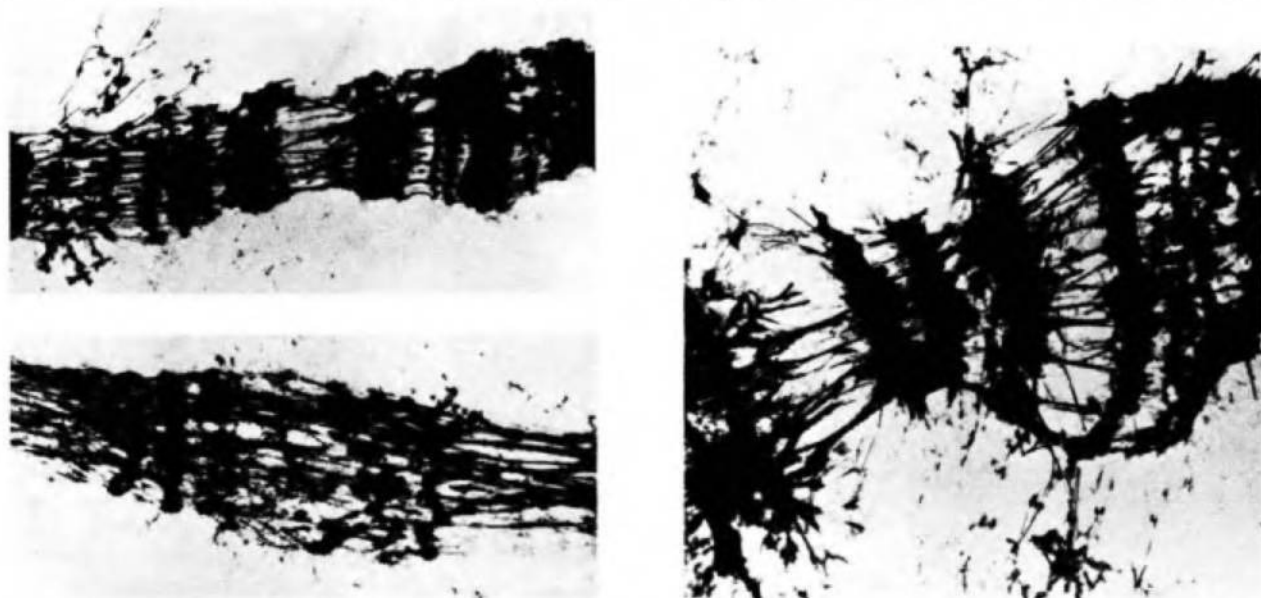


Рис. 9.2. Диски (темные области) и междиски (светлые области) в политенных хромосомах дрозофилы (фотографии получены с помощью просвечивающего электронного микроскопа). Хроматин в дисках сильно конденсирован по сравнению с хроматином в междисках. На фотографиях показаны хромосомы в разной степени растяжения, для того чтобы можно было увидеть ультраструктуру дисков. (Из Burkholder, 1976; фотографии с любезного разрешения G. D. Burkholder.)

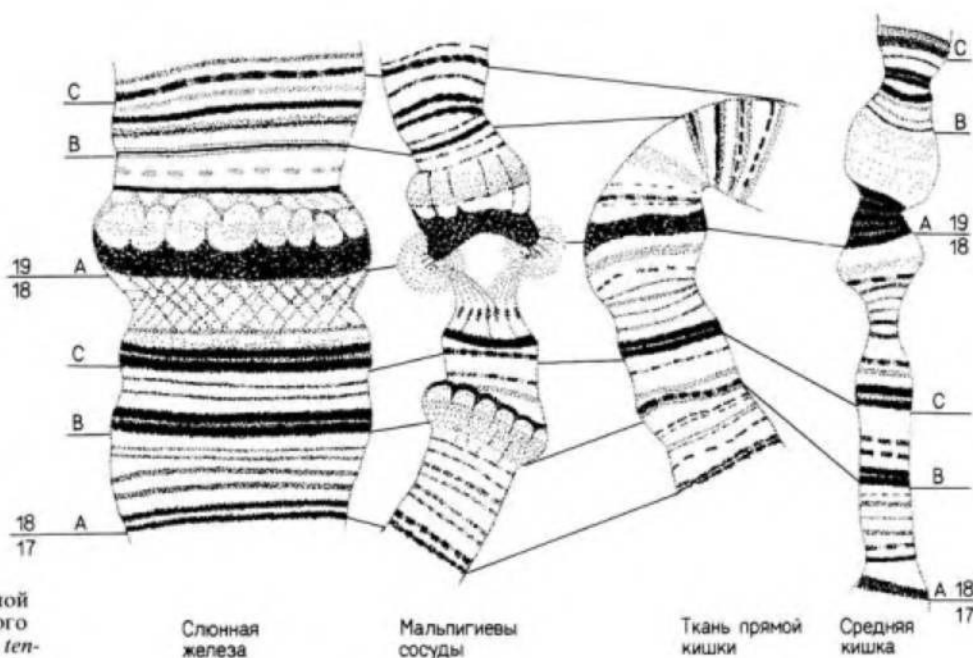


Рис. 9.3. Участок политенной хромосомы из хромосомного набора комара *Chironomus tentans*. Обратите внимание на постоянство числа дисков в разных тканях. Латинскими буквами и цифрами слева и справа от рисунка обозначены локализация участка и положение дисков внутри его. (По Beermann, 1952.)

выявлено утраты какого-либо из их участков. Когда появилась возможность изучать индивидуальные хромосомы позвоночных, удалось установить, что число хромосом в разных тканях взрослого организма постоянно (Tjio, Ruck, 1958). Как мы узнаем позже, в разных исследованиях было показано, что состав и свойства ДНК, экстрагированных из разных соматических тканей, очень сходны.

Другие данные, свидетельствующие об эквивалентности генома, были получены в эмбриологических исследованиях. Дриш и Шпеман (гл. 8) четко показали, что ядра ранних бластомеров морских ежей и тритонов **тотипотентны**, т. е. способны обеспечить дифференцировку любых типов клеток. В их опытах бластомер, который в норме должен был бы дать начало лишь части зародыша, оказался способным дать в процессе развития целый организм. Следовательно, его ядро должно было содержать гены, необходимые для образования всех других типов клеток. Кроме того, Шпеман обнаружил, что проспективное значение клеток, взятых у зародыша тритона на стадии ранней гаструлы, меняется после пересадки их в другую область зародыша. Можно ли экстраполировать результаты этих эмбриологических исследований на клетки, которые уже детерминированы к дифференцировке в определенном

направлении? Сохраняют ли детерминированные или дифференцированные клетки другие потенции к развитию? Излагаемые ниже данные, полученные в двух направлениях исследований, приводят к положительному ответу на эти вопросы.

Трансдетерминация

Личинка дрозофилы после вылупления имеет две четко различающиеся популяции клеток. Ее ткани образованы примерно 10000 клеток. У большей части клеток имеются политенные хромосомы; эти клетки интенсивно растут, увеличиваясь в объеме примерно в 150 раз. Помимо этого, еще около 1000 клеток с диплоидными (неполитенными) ядрами образуют скопления в различных областях личинки. Такие скопления недифференцированных клеток называются **имагинальными дисками** (от латинского слова «имаго», означающего «взрослый»). Эти клетки делятся в течение всего периода роста личинки. Во время метаморфоза гормон **эклистерон** вызывает огромные изменения во всем организме (гл. 19). Личиночные клетки дегенерируют, тогда как имагинальные диски получают сигналы к дифференцировке в органы взрослой мухи. На рис. 9.4 показано расположение имагинальных дисков и перечислены структуры, которые из них развиваются.

Клетки имагинальных дисков личинки детерминированы. Так, например, глазной диск можно удалить у одной личинки и имплантировать его в брюшко другой. После метаморфоза муха, развившаяся из этой второй личинки, будет иметь

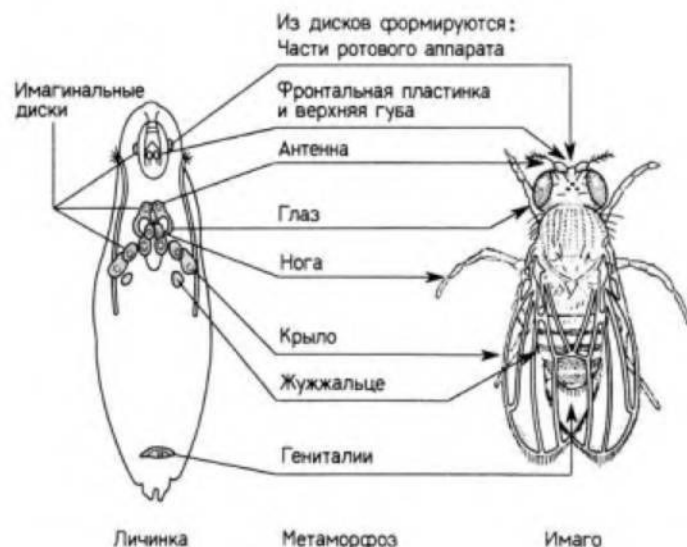


Рис. 9.4. Локализация и перспективное значение имагинальных дисков у *Drosophila melanogaster*. (По Fristrom et al., 1969.)

лишний глаз на брюшке. Если трансплантировать часть имагинального диска, то разовьется только часть глаза. Таким образом, трансплантация диска или его фрагмента личинке – прекрасный метод для тестирования состояния их детерминации, т.е. того, какая структура или ее фрагмент возникнет из этого диска при метаморфозе. Однако, когда диски трансплантируют *взрослым мухам*, они не дифференци-

руются, а их клетки продолжают пролиферировать. Эти пролиферирующие клетки можно непрерывно культивировать, пересаживая их от одной взрослой мухи к другой. Вместе с тем можно вновь тестировать состояние детерминации клеток диска путем удаления у мухи фрагментов растущих дисков и помещения их в личинку, претерпевающую метаморфоз (рис. 9.5).

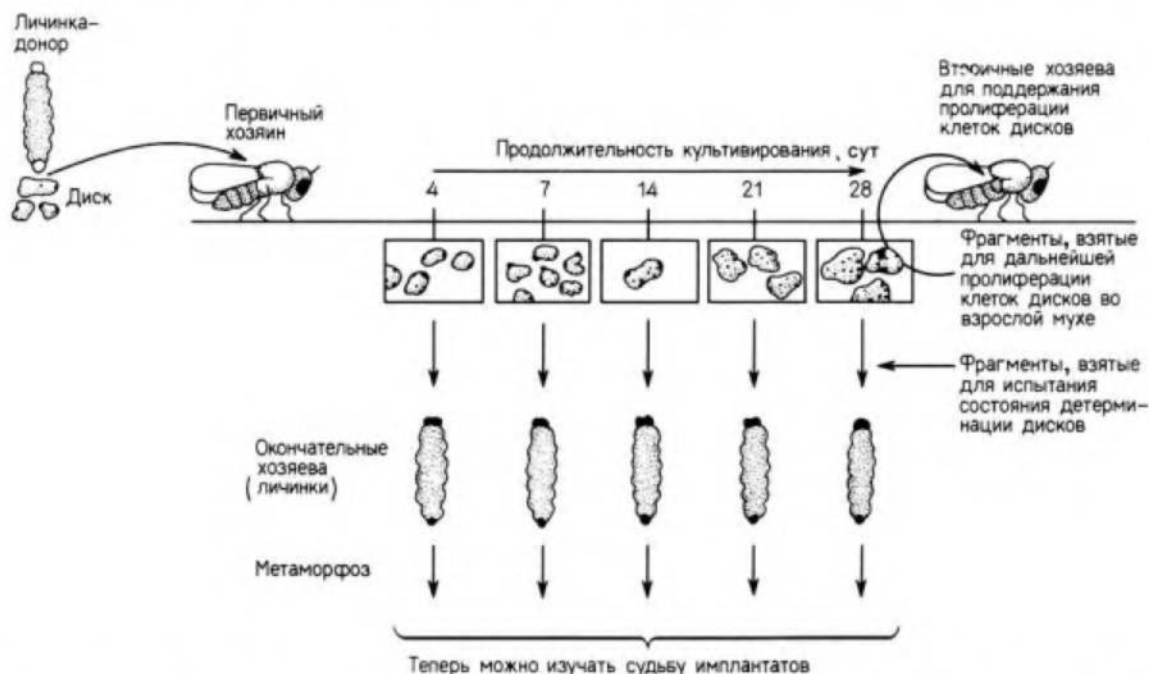


Рис. 9.5. Тестирование потенций имагинальных дисков. Диски вырезали и помещали во взрослых мух, где клетки этих дисков делились. Если диски удаляли из взрослых мух через различные сроки инкубации и пересаживали в нормальных личинок, то после метаморфоза из них формировались структуры взрослого организма. (По Markert, Ursprung, 1971.)



Рис. 9.6. Трансдетерминация структур антенны в структуры ноги. А. Трансдетерминация антеннального диска, пересаженного по схеме, показанной на рис. 9.5. Помимо нормальных структур антенны (AIII – третий антеннальный сегмент; Ap – аристы) развились структуры ноги, такие, как тарзальные щетинки (ТЩ) и связанные с ними бракты (б). Б. Голова взрослой мухи, несущей мутацию *Antennapedia*. У этого мутанта антенны почти полностью превратились в нормальные ноги. Мутации, обуславливающие превращение одной структуры в другую, называются гомеозисными мутациями (гл. 18). Хотя механизм трансдетерминации дисков, вероятно, отличается от механизма гомеозисных мутаций, оба они демонстрируют изменения судьбы дисков. (А – из Gehring, 1969; с любезного разрешения W. T. Gehring; фотография на рис. 9.6, Б любезно предоставлена J. Haynie.)

Эрист Хадорн с коллегами (Hadorn, 1968) использовали методику пересадки дисков, чтобы показать, что клетка может изменять свое коммитированное состояние. Обычно фрагменты диска, детерминированного к образованию антенн, продолжали образовывать антеннальные структуры каждый раз, когда их тестировали, даже после нескольких серийных трансплантаций таких фрагментов взрослым мухам. Однако результат одного опыта удивил исследователей: вместо монотонного образования антеннальных структур участки антеннального диска формировали части ног, ротового аппарата или крыла. Это явление названо **трансдетерминацией**. Вместо развития в «собственный» орган имагинальные клетки развивались в другую часть взрослой мухи. Например, из диска, в норме детерминированного к развитию антенны, могла возникнуть структура, свойственная ноге взрослой мухи (рис. 9.6). Кроме того, подобно исходному состоянию детерминации, трансдетерминированное состояние оказалось относительно стабильным и наследовалось клетками диска на протяжении многих поколений.

Трансдетерминация чаще наблюдается после нескольких пассажей через взрослых мух и происходит преимущественно в определенных направлениях (рис. 9.7). Из диска крыла, например, могут возникнуть структуры груди, но грудные диски никогда не

дифференцируются в части крыла. Генитальные диски могут дать начало антеннам или ногам, но никогда не наблюдается образования генитальных структур из дисков других типов. Причина такой направленности остается неизвестной, однако ясно, что детерминированные клетки могут дать начало иным типам клеток, чем те, которые образуются из них в норме. Следовательно, в клетках имагиналь-

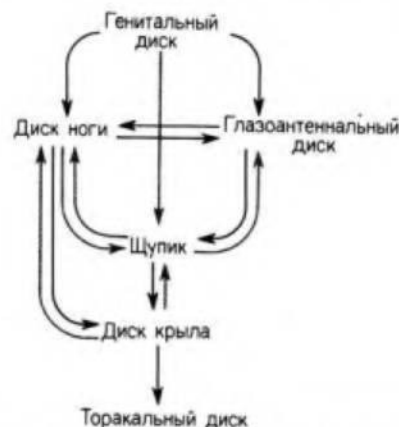


Рис. 9.7. Пути трансдетерминации имагинальных дисков. Черными стрелками показаны часто наблюдаемые изменения; серые стрелки указывают на более редкие события.

ных дисков сохраняются гены для специфических продуктов, которые в норме синтезируются клетками других типов.

Метаплазия

Результаты экспериментов по регенерации глаз у тритонов показали, что даже *дифференцированные* клетки взрослого организма могут сохранять потенции к образованию клеток других типов. Удаление сетчатки у тритона стимулирует ее регенерацию из пигментного эпителия, а новый хрусталик может сформироваться из клеток дорсальной радужки. Этот последний тип регенерации (названный вольфовской регенерацией по имени ученого, первым обнаружившего это явление) интенсивно изучался Тунео Ямадой и его коллегами (Jamada, 1966; Dumont, Jamada, 1972). Они обнаружили, что после удаления хрусталика происходит ряд событий, в

результате которых радужка образует новый хрусталик (рис. 9.8).

1. Меняется форма ядер клеток радужки.
2. В клетках дорсальной части радужки образуется огромное количество рибосом.
3. ДНК этих клеток реплицируется, и вскоре клетки начинают делиться.
4. Происходит дедифференцировка этих клеток. Они выбрасывают меланосомы (продукты дифференцировки, придающие глазу его характерный цвет), которые перевариваются макрофагами, проникающими в рану.
5. Клетки дорсальной части радужки продолжают делиться, формируя дедифференцированную ткань в области удаленного хрусталика.
6. В дедифференцированных клетках радужки начинается синтез специфических для клеток хрусталика продуктов — белков кристаллинов.

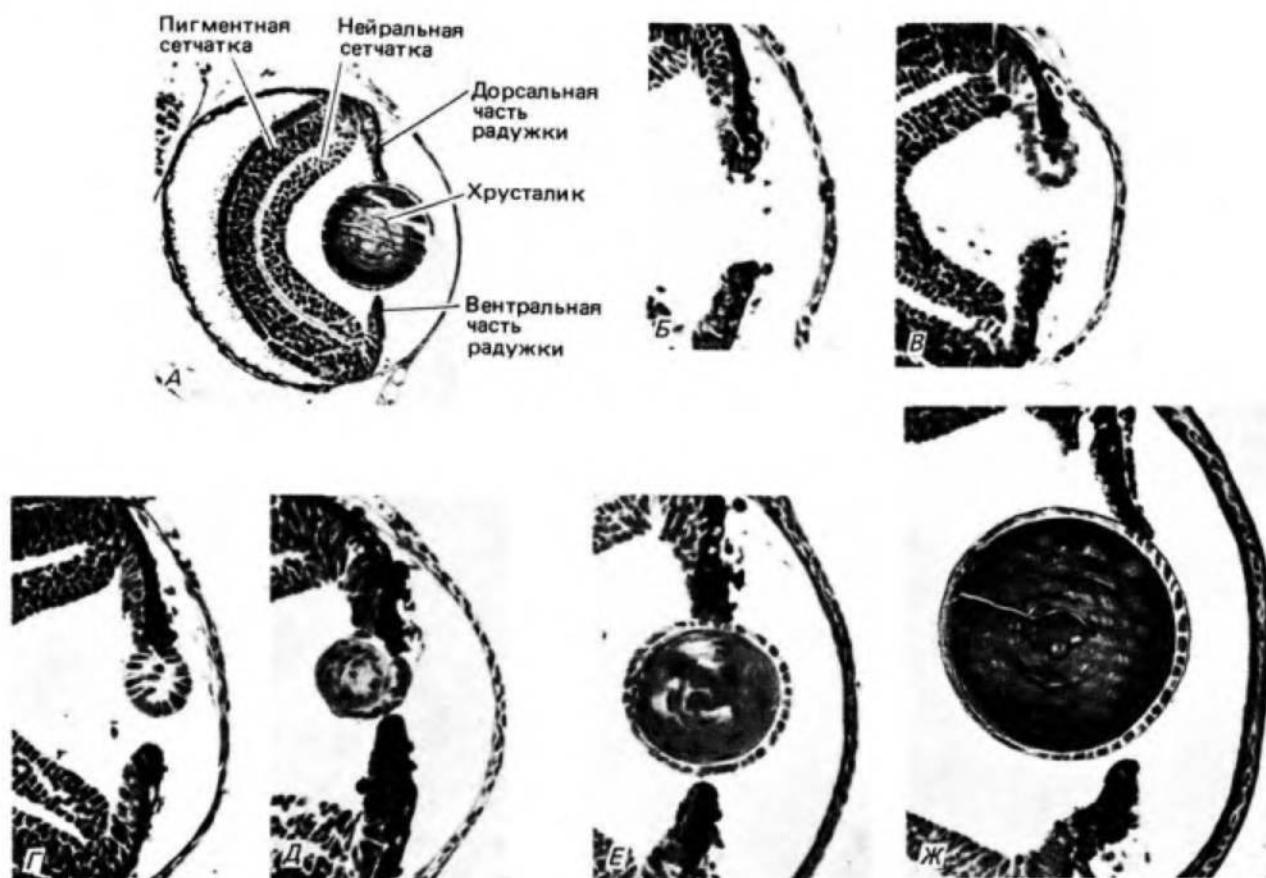


Рис. 9.8. Вольфовская регенерация хрусталика из дорсального края радужки у тритона. А. Нормальный неоперированный глаз личинки тритона *Notophthalmus viridiscens*. Б–Ж. Процесс регенерации хрусталика, наблюдаемый на сроках 5, 7, 9, 16, 18 и 30 сут после удаления хрусталика. Образование нового хрусталика завершается к 30 сут. (Из Reyer, 1954; фотографии с любезного разрешения R. W. Reyer.)

Эти белки синтезируются в такой же последовательности, как и при развитии нормального хрусталика.

7. Как только сформировался новый хрусталик, деления клеток дорсальной части радужки прекращаются.

Перечисленные события нельзя считать нормальным путем образования хрусталика. Вспомним, что в эмбриогенезе хрусталик образуется из слоя эпителиальных клеток, индуцированных клетками передней стенки глазного пузыря. Процесс формирования хрусталика из дифференцированных клеток радужки называется **метаплазией**; явление это состоит в превращении (трансформации) одного типа дифференцированных клеток в другой. Следовательно, данные, полученные генетиками и биологами развития, подтверждают гипотезу дифференциальной экспрессии генов в генетически идентичных ядрах.

Клонирование у амфибий: ограничение потенций клеток

Окончательно решить вопрос о том, является ли сужение функций ядра дифференцированной клетки необратимым, было бы можно, проверив способ-

ность этого ядра индуцировать образование дифференцированных клеток любого другого типа. В 1938 г. Ганс Шпеман предложил, по его словам, «фантастический» опыт, чтобы ответить на вопрос о том, действительно ли геномы в разных клетках идентичны. Для этого следует имплантировать ядро какой-либо дифференцированной клетки в яйцо, собственное ядро которого предварительно было удалено. Если любое пересаженное ядро идентично ядру зиготы, то оно должно обеспечить полное развитие организма. Однако для проведения такого опыта необходимо было прежде всего разработать три методики: 1) методику энуклеации яиц-реципиентов без их разрушения; 2) методику изоляции неповрежденных ядер; 3) методику переноса таких ядер в яйцо без повреждения и ядра, и яйца.

Указанные методики были разработаны Робертом Бриггсом и Томасом Кингом. Эти исследователи комбинировали энуклеацию яйца с его партеногенетической активацией. Если яйцеклетку леопардовой лягушки (*Rana pipiens*) уколоть стеклянной иглой, то в ней начнут происходить все цитологические и биохимические изменения, связанные с оплодотворением: разрушаются кортикальные гранулы, перемещается внутренняя цитоплазма, а вблизи анимального полюса завершается мейоз.

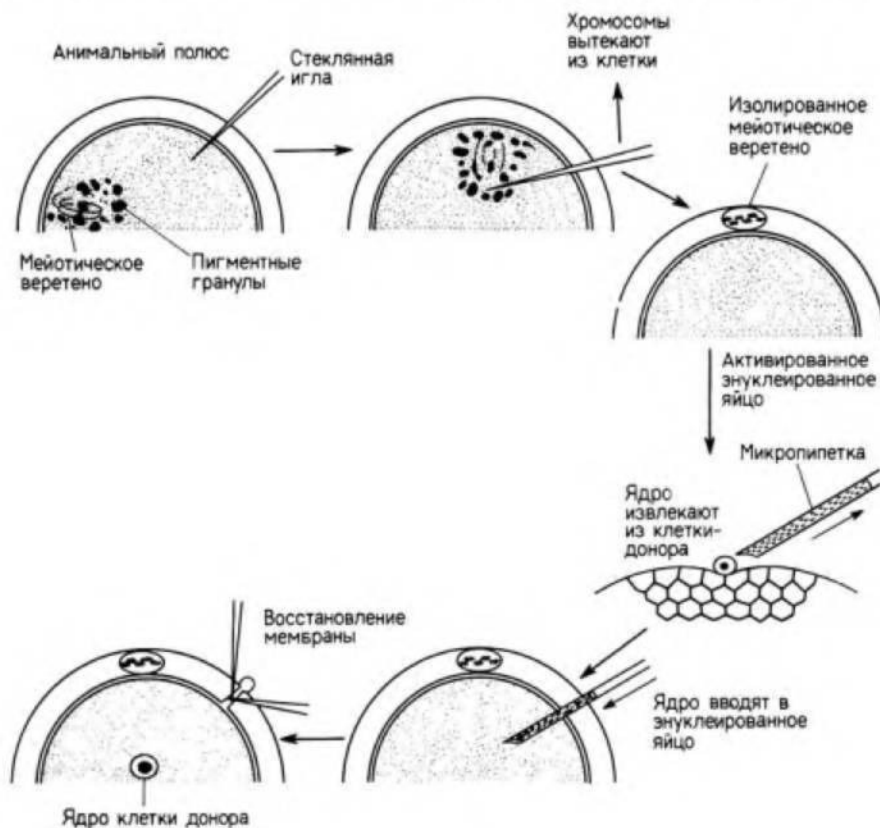


Рис. 9.9. Процедура пересадки ядер бластулы в активированные энуклеированные яйца *Rana pipiens*. Относительные размеры мейотического веретена сильно увеличены, чтобы сделать более наглядной методику пересадки. (По King, 1966.)



Рис. 9.10. Этот великолепный экземпляр *Rana pipiens* был получен с помощью трансплантации ядра бластулы в активированное энуклеированное яйцо. (Фотография любезно предоставлена M. DiBerardino, N. Hoffner.)

Положение мейотического веретена в яйце легко определить, поскольку на анимальном полюсе пигментные гранулы удаляются от него и прокол яйца в этом месте приводит к вытеканию мейотического веретена вместе с хромосомами наружу (рис. 9.9). Теперь яйцо является и активированным (так как процессы, необходимые для начала развития, завершены), и одновременно энуклеированным. В энуклеированные яйца переносят ядра из клеток-доноров. Для этого клетку разывают, с помощью микропипетки захватывают ее ядро и вводят его в яйцо-реципиент. Вместе с ядром в яйцо попадает и некоторое количество окружающей его цитоплазмы клетки-донора, но соотношение цитоплазмы

донора и реципиента столь ничтожно ($1:10^5$), что вряд ли она оказывает какое-либо влияние на исход опыта.

В 1952 г. Бриггс и Кинг (Briggs, King, 1952) показали, что ядра, взятые у зародыша на стадии бластулы, будучи перенесенными в цитоплазму яйцеклетки, обеспечивают развитие полностью сформированного головастика. Еще раньше Шпеман продемонстрировал, что клетки бластулы не детерминированы и, следовательно, их ядра тотипотентны. Поэтому если система переноса ядер работает, то ядра бластулы должны быть способны обеспечить полное развитие. Именно это и наблюдается в опытах по пересадке ядер бластулы. Шестьдесят процентов всех имплантированных ядер оказались способными направлять развитие яиц до стадии свободно плавающего головастика; все эти головастики были диплоидными (результат, подтверждающий, что их ядра происходили из ядра клетки-донора). Следовательно, система переноса ядер работает и ее можно использовать для изучения потенций ядра (рис. 9.10).

Что произойдет, если в активированное энуклеированное яйцо пересадить ядро из клетки зародыша, находящегося на более продвинутой стадии развития? Результаты опытов Кинга и Бриггса (King, Briggs, 1956) суммированы на рис. 9.11. Из этого рисунка видно, что большинство ядер из клеток

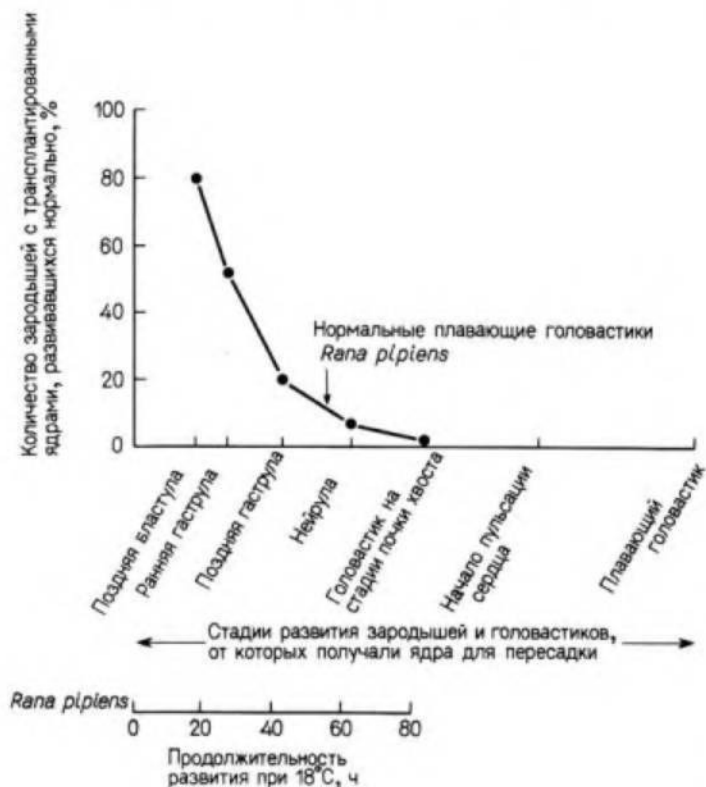


Рис. 9.11. Зависимость результата трансплантации ядер от стадии развития, на которой были взяты ядра. На оси абсцисс обозначены стадии развития, на которых изолировали ядро из клетки-донора *Rana pipiens* и вводили его в активированное и энуклеированное яйцо. По оси ординат отложено количество успешно развивающихся до стадии бластулы и далее до стадии плавающего головастика яиц с трансплантированными ядрами. (По McKinnell, 1978.)

бластулы способны обеспечить развитие яиц-реципиентов до стадии нормальных свободно плавающих головастиков, однако в ядрах, взятых от доноров, находящихся на более поздних стадиях развития, эта способность резко ограничивается. Ни одно из ядер *соматических клеток*, взятых на стадии хвостовой почки, не могло дать информацию, необходимую для развития нормального зародыша. Однако, когда на той же стадии брали ядра *половых клеток* (в норме дающих после оплодотворения начало целому организму), в 40% случаев были получены бластулы, способные к дальнейшему развитию (Smith, 1956). Следовательно, соматические клетки, становясь детерминированными и дифференцированными, по-видимому, утрачивают способность обеспечивать полное развитие организма.

Было показано, что ограничение потенций ядер по мере развития является стабильным и тканеспецифическим признаком. Данные в пользу этого получали в следующих опытах. Число энтодермальных ядер, взятых на стадии поздней гаструлы, увеличивали путем серийных пересадок. С этой целью одно ядро переносили в энуклеированное яйцо; развившийся в результате такой процедуры зародыш имел на стадии бластулы тысячи идентичных ядер. Ядра этой бластулы снова переносили в энуклеированные яйца и таким образом получали много копий первоначального ядра, что позволяло количественно оценить его потенции. Такая методика называется **клонированием ядер** (рис. 9.12). При трансплантации неклонированных ядер наблюдается большая изменчивость в способности ядер, полу-

ченных от разных доноров, обеспечивать развитие. Некоторые ядра обеспечивают весь путь развития до стадии свободно плавающего головастика, тогда как другие — только до стадии аномальной гаструлы. Кинг и Бриггс считали эту изменчивость в *разных* клонах нормальной. Однако они обнаружили, что *в пределах одного* клона все ядра обладают одинаковыми потенциями. Каждый клон имел «характерный» фенотип, и часто стадия, на которой останавливалось развитие особей, полученных в результате пересадки ядер — потомков одного клонированного ядра энтодермальной клетки, была сходной. Это наблюдалось и при трансплантации ядер, клонированных в течение нескольких поколений. Кроме того, если личинки развивались с какими-либо дефектами, то эти дефекты у всех личинок были одинаковыми. Все личинки с клонированными ядрами имели энтодермальные структуры (а именно, кишку), но у них отсутствовали некоторые производные мезодермы или эктодермы. По-видимому, ядра из клеток энтодермы пригодны для формирования энтодермы, но их способность к формированию эктодермы или мезодермы ограничена. Сходная утрата потенций была обнаружена и в ядрах клеток эктодермы (DiBerardino, King, 1967). Аномальные головастики имели превосходно дифференцированные нейральные структуры, но у них отсутствовали энтодермальные производные. Таким образом, прогрессивное ограничение потенций ядер по мере развития является, по-видимому, общим правилом. Не исключено, что ядра разных дифференцированных клеток отличаются друг от друга.

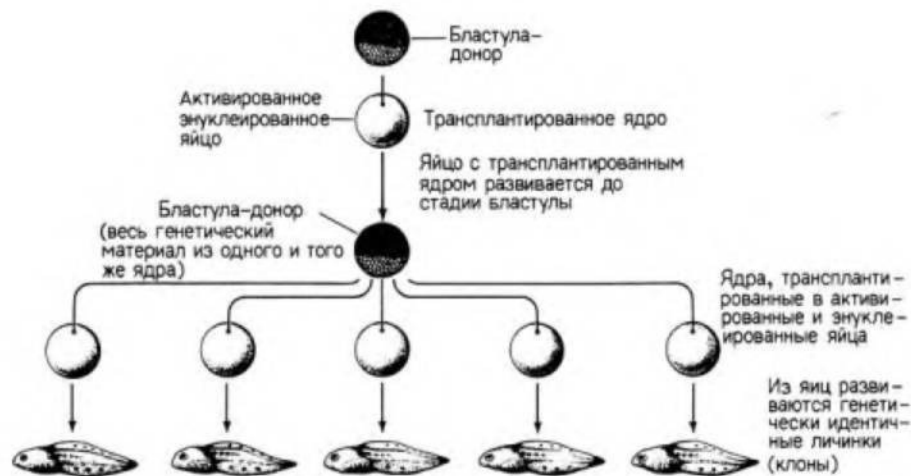


Рис. 9.12. Изучение потенций ядер методом их серийных пересадок. Ядро, полученное из клетки одной бластулы, вводят в активированное энуклеированное яйцо. Бластула, развившаяся из этого яйца, служит источником ядер для второго поколения зародышей, развившихся из энуклеированных яиц; этот процесс называется клонированием ядер.

Клонирование у амфибий: исключения из ограничения потенций

Можно, однако, и по-иному объяснить ограничение потенциалов ядер в дифференцированных клетках. Перенос ядра дифференцированной клетки в цитоплазму зрелого яйца, мы тем самым заставляем его вернуться к теперь уже не свойственному ему физиологическому состоянию. У лягушек в период дробления ядра клеток делятся с очень высокой скоростью, тогда как в некоторых дифференцированных клетках они делятся редко или не делятся вообще. Неспособность к репликации ДНК быстро приводит к поломкам хромосом; такие хромосомные аномалии наблюдаются во многих клетках головастиков, развившихся из яиц, содержащих клонированные ядра. Джон Гёрдон и его коллеги, используя несколько измененную методику пересадки ядер, получили результаты, показывающие, что многие из ядер дифференцированных клеток остаются тотипотентными.

Главное различие между опытами Гёрдона и опытами Бригса и Кинга заключалось в выборе объекта исследований. Гёрдон изолировал ядра из клеток *Xenopus laevis*, южноафриканской шпорцевой лягушки. Эта лягушка (рис. 9.13) гораздо более



Рис. 9.13. Спаривание у *Xenopus laevis*. Маленький самец обхватывает самку и осеменяет свежесложенные яйца снаружи. (Из Deuchar, 1975.)

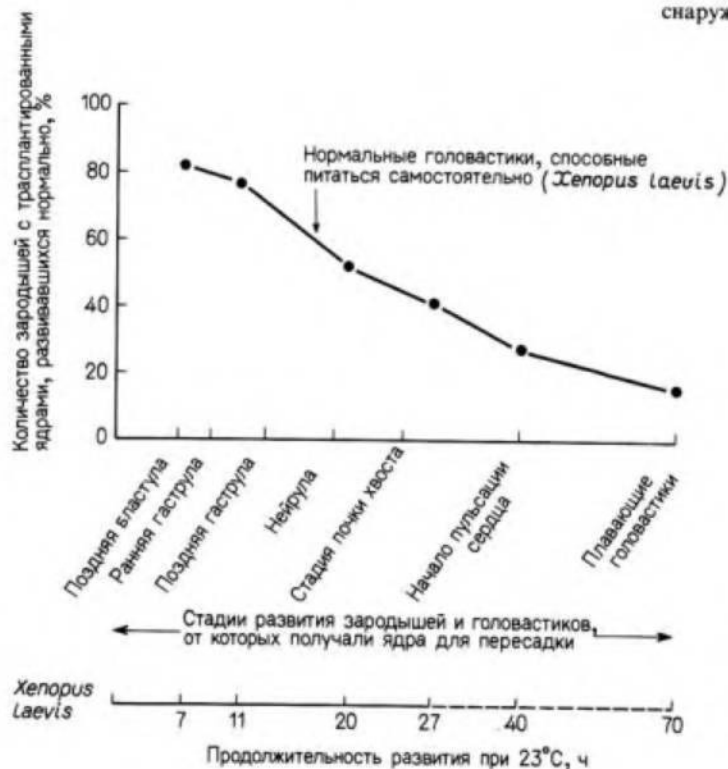


Рис. 9.14. Зависимость результата трансплантации ядер от стадии развития донора ядер. Сравните с кривой на рис. 9.11. Ядра из клеток *Xenopus laevis*, взятые на более поздних стадиях развития, дают в общем лучший результат, чем ядра, взятые из клеток *Rana pipiens* на тех же стадиях развития. (По McKinnell, 1978.)

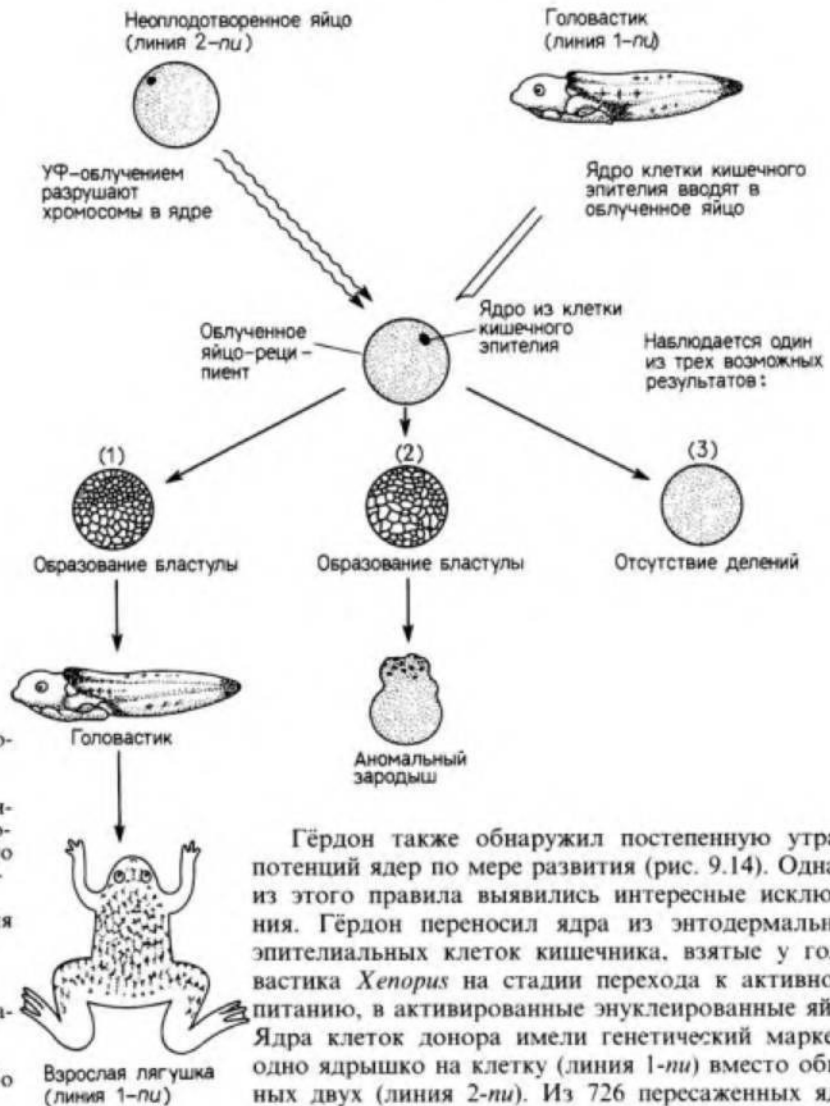


Рис. 9.15. Процедура получения половозрелых особей шпорцевой лягушки посредством трансплантации ядер клеток кишечного эпителия головастика в энуклеированные яйца. Хромосомы в яйце шпорцевой лягушки дикого типа (с двумя ядрышками – 2- ν) разрушают УФ-облучением и вводят в него ядро клетки кишечного эпителия головастика шпорцевой лягушки из линии с одним ядрышком (1- ν). В одних случаях яйцо не делится, в других – развитие зародыша нарушается, но в ряде случаев развивается нормальная взрослая особь, клетки которой содержат одно ядрышко. (По Gurdon, 1968, 1977.)

примитивна, чем *Rana pipiens*; у нее отсутствуют веки, среднее ухо и даже язык, столь характерный для позднее эволюционировавших видов *Rana*. Шпорцевая лягушка отличается также и по биологии развития. В отличие от леопардовой лягушки взрослая особь *Xenopus* способна регенерировать утраченные конечности; раннее развитие у нее протекает в три раза быстрее, чем у леопардовой лягушки. В частности, для достижения стадии хвостовой почки зародышу *Rana pipiens* требуется 80 ч, тогда как *Xenopus laevis* достигает той же стадии развития всего за 26 ч. Следовательно, ядра энтодермальных клеток на стадии хвостовой почки у шпорцевой лягушки имеют такой же возраст, как ядра из клеток ранней гаструлы у *Rana* (McKinnell, 1978).

Гёрдон также обнаружил постепенную утрату потенций ядер по мере развития (рис. 9.14). Однако из этого правила выявились интересные исключения. Гёрдон переносил ядра из энтодермальных эпителиальных клеток кишечника, взятые у головастика *Xenopus* на стадии перехода к активному питанию, в активированные энуклеированные яйца. Ядра клеток донора имели генетический маркер – одно ядрышко на клетку (линия 1- ν) вместо обычных двух (линия 2- ν). Из 726 пересаженных ядер только 10 оказались способными обеспечить развитие зиготы до стадии донора. Число ядер, обеспечивающих развитие, удалось повысить до 7% (Gurdon, 1962) с помощью метода серийных пересадок (переноса ядра из клеток кишечника в яйцо и после достижения яйцом-реципиентом стадии бластулы, последующего переноса ядер клеток бластулы в большее число яиц). В некоторых случаях ядра были способны реализовать информацию, достаточную для достижения стадии головастика и образования клеток всех линий – нейронов, клеток крови и др. Кроме того, семь головастиков (развившихся после пересадки в яйца ядер, полученных клонированием двух исходных ядер) метаморфизировали и превратились в половозрелых взрослых лягушек (Gurdon, Uehlinger, 1966). Эти ядра были тотипотентными (рис. 9.15).

Однако Кинг и его коллеги с сомнением отнеслись к опытам Гёрдона, считая, во-первых, что исследователи не приняли достаточных мер предосторожности, исключая возможность использования вместо ядер кишечника ядер первичных половых клеток, которые, мигрируя, часто задерживаются в кишке, и, во-вторых, что эпителиальные клетки кишечника таких ранних, перешедших на активное питание головастика могут не обладать свойствами вполне дифференцированных клеток. У них эти клетки еще содержат желточные пластинки (DiBerardino, King, 1967; McKinnell, 1978; Briggs, 1979).

В ответ на эти критические замечания Гёрдон и его коллеги провели следующие опыты. Они культивировали эпителиальные клетки из кожных межпальцевых перепонки ноги взрослой особи *Xenopus*. Эти клетки были, безусловно, дифференцированными, потому что каждая из них содержала кератин-белок, характерный для клеток кожи взрослых особей. Когда ядра этих клеток пересаживали в энуклеированные яйца, ни одно из ядер не обеспечивало развития зародышей дальше нейрулы. Однако после клонирования ядер и их пересадки в энуклеированные яйца из таких яиц развивались многочисленные головастики; правда, все они погибали, не переходя на активное питание (Gurdon et al., 1975). Сходную остановку развития наблюдали другие исследователи (Wabl et al., 1975), пытаясь

получить взрослых лягушек при пересадке ядер лимфоцитов. Ди Берардино (DiBerardino, 1987) пришла к заключению, что «на сегодня еще не доказано, что ядра клеток хотя бы одного какого-либо специализированного типа или клеток взрослого организма являются тотипотентными».

Результаты опытов по клонированию ядер у амфибий позволяют сделать два вывода. Во-первых, в них можно увидеть общее правило ограничения потенций в процессе развития. Это ограничение генетически детерминировано и характерно для ядер определенного типа клеток-доноров. Во-вторых, можно легко убедиться в том, что геном дифференцированной клетки обладает изумительной способностью инициировать образование всех типов клеток головастика. Ядро эритроцита лягушки, в котором никогда не происходит репликации ДНК (и синтеза мРНК), может претерпеть при серийных пересадках в общей сложности свыше 100 делений и все же сохранить способность обеспечивать развитие энуклеированного и активированного яйца в свободно плавающего головастика (Orr et al., 1986). Другими словами, даже если еще и ведутся споры о *тотипотентности* таких ядер, то в том, что они в высокой степени *полипотентны*, сомневаться не приходится. Ясно одно — многие неиспользованные гены клеток кожи или крови могут реактивироваться и обеспечить образование нервов, желудка и сердца свободно плавающего головастика.

Дополнительные сведения и гипотезы

Клонирование

Как мы уже убедились ранее, обсуждая работы Ру и Дриша, детали экспериментальной методики могут сильно повлиять на получаемые результаты. Незначительное изменение процедуры клонирования ядер леопардовой лягушки привело к тому, что ядра, взятые даже на поздней стадии развития, обеспечивали развитие нормальной личинки. Салли Хеннен (Hennen, 1970) показала, что эффективность действия ядер донора можно увеличить, обработав их перед трансплантацией спермином или охладив яйца после пересадки, чтобы дать ядру время для адаптации к цитоплазме яйца. Обработывая таким способом ядра энтодермальных клеток, взятых у зародыша леопардовой лягушки на стадии хвостовой почки, и пересаживая затем эти ядра в энуклеированные яйца, Хеннен в 60% случаев получала нормальных личинок (в контрольных опытах процент таких личинок был равен нулю). Однако обработка ядер, взятых из дифференцированных клеток кожи взрослых лягушек, спермином не приводила

к развитию взрослых особей из энуклеированных яиц, в которые пересаживали эти ядра.

Клонирование человека из дифференцированных клеток, похоже, стало задачей некоторых журналистов и писателей (писатели задавались целью воспроизводить важных политических деятелей, таких, как Гитлер или Кеннеди, а журналисты возмечтали распространить эту методику на атлетов и кинозвезд). Из предыдущего обсуждения очевидно, что клонирование полностью развитого индивидуума из дифференцированных клеток — невероятно трудное дело, да и результаты этих опытов не вполне убедительны. Даже у амфибий ядра дифференцированных клеток, взятые у взрослого животного, не способны после их пересадки в активированные и энуклеированные яйца обеспечить развитие из этих яиц взрослого животного.

Но даже если бы и удалось вырастить взрослых лягушек из яиц, в которые были пересажены ядра дифференцированных клеток, то этот результат

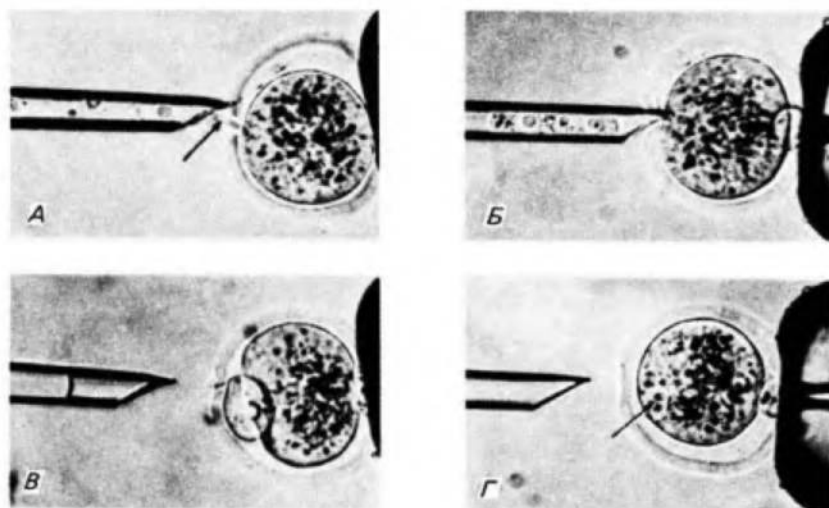


Рис. 9.16. Процедура переноса ядер в активированное энуклеированное яйцо млекопитающего. Одиноклеточный зародыш, инкубируемый в среде с колленидом и цитохалазином, удерживают на месте присасывающей пипеткой. Энуклеирующей пипеткой прокалывают прозрачную оболочку (zona pellucida) и втягивают в пипетку прилежащую к пронуклеусам клеточную (плазматическую) мембрану вместе с частью клетки, содержащей пронуклеусы. Затем энуклеирующую пипетку вытягивают из яйца (А) и тем самым удаляют из него содержащую пронуклеусы цитоплазму. Клеточная мембрана остается неразрушенной; стрелкой указана связь с плазматической мембраной яйца. Б. В пипетке клеточная мембрана образует пузырек с цитоплазмой и пронуклеусами внутри. В. Этот пузырек вместе с вирусом Сендай вводят в перивителлиновое пространство между прозрачной оболочкой и мембраной другой энуклеированной зиготы. Г. Вирус Сендай способствует слиянию энуклеированного яйца с окруженными мембраной пронуклеусами, что позволяет им попасть в клетку (стрелка). Полярное тельце, лежащее возле присасывающей пипетки, в реакцию слияния не вступает. (Из McGrath, Solter, 1983; с любезного разрешения авторов.)

нельзя экстраполировать на человека. Не говоря уже об этических проблемах, при работе с человеческим материалом исследователь сталкивается с многочисленными трудностями. Если у самки амфибий одновременно созревают сотни яиц, то у женщины ежемесячно образуется очень мало зрелых яиц. Кроме того, цитоплазма из яйцеклетки женщины может существенно отличаться от цитоплазмы яйцеклетки лягушки по своей способности воспринимать сигналы, исходящие из ядра клетки, которая находится на более продвинутой стадии развития.

Пересадки ядер были впервые осуществлены у мышей. С этой целью у одной зиготы удаляли оба пронуклеуса и замещали их пронуклеусами, взятыми из другой зиготы (McGrath, Solter, 1983). Процедура этого опыта показана на рис. 9.16. Сначала одноклеточных зародышей инкубируют в среде с цитохалазином и колхицином, чтобы ослабить микрофиламенты и микротрубочки цитоскелета. Затем зародыша удерживают на месте с помощью присасывающей пипетки, а пипеткой для энуклеации прокалывают прозрачную оболочку (zona pellucida) яйца. Цитоплазматическую мембрану клетки энуклеирующей пипеткой не прокалывают, а лишь нажимают ею на область, где находятся пронуклеусы, и втягивают внутрь пипетки этот участок

мембраны вместе с прилежащей к нему цитоплазмой и пронуклеусами (А). Затем пипетку оттягивают и тем самым цитоплазму с пронуклеусами отделяют от яйца. Эта цитоплазма окружена плазматической мембраной (Б). Пипетку с пронуклеусами, окруженными мембраной, погружают в каплю, содержащую инактивированный вирус Сендай, который вызывает слияние мембран. После всасывания некоторого количества вируса пипетку приближают к другой зиготе, из которой таким же образом были удалены пронуклеусы. Прокалывают прозрачную оболочку и вводят пронуклеусы вместе с окружающей их мембраной в перивителлиновое пространство между оболочкой яйца и его плазматической мембраной (В). Затем зародыш инкубируют при температуре 37°C до момента слияния мембраны яйца-хозяина и донора ядер (Г). Таким образом два пронуклеуса донора попадают в цитоплазму хозяина. Через пять дней культивирования зародыши достигают стадии бластоцисты, и их можно имплантировать в матку приемной псевдобеременной взрослой самки. Родившийся мышенок имеет фенотип мыши, служившей донором ядер.

Свыше 90% энуклеированных зигот мыши, получивших ядра из других зигот, успешно развивались до стадии бластоцисты. Когда же в энуклеированные зиготы пересаживали ядра 4-клеточных



Рис. 9.17. Опыты Стюарда, демонстрирующие тотипотентность клеток флоэмы моркови.

зародышей, ни одна зигота (из 81) не достигала стадии бластоисты. Точно так же ядра из клеток 8-клеточного зародыша и из клеток внутренней клеточной массы были не способны поддерживать развитие до предимплантационных стадий (McGrath, Solter, 1984). В отличие от морских ежей и амфибий у мышей ядра ранних бластомеров (которые, как известно, являются тотипотентными) не способны обеспечить полное развитие. Эти опыты не удаются, по-видимому, из-за того, что ядра бластомеров не могут правильно функционировать в цитоплазме зиготы. Таким образом, вряд ли стоит серьезно относиться к идее (высказанной в сентябре 1984 г. в журнале «National Examiner») о клонировании второго Элвиса Пресли из его дифференцированной клетки. Однако свойства ранних бластомеров не у всех млекопитающих одинаковы; разные виды сильно различаются по времени активации и имплантации зародышей в матку. Недавно появилось сообщение (Willadsen, 1986) о том, что, используя модифицированную методику трансплантации ядер, автор получил ягнят из зигот, в которые были пересажены ядра бластомеров 8-клеточного зародыша. У мыши ядра бластомеров не способны направлять развитие зиготы, а у овцы они, по-видимому, могут это делать. Если указанное сообщение подтвердится, его результаты будут иметь огромное значение для сельского хозяйства.

Случаи несомненной способности ядер клеток взрослого организма обеспечивать развитие другого взрослого организма обнаружены только у растений. Эта способность чрезвычайно четко продемонстрирована на клетках моркови и табака. В 1958 г. Стюард и его коллеги разработали методику, позволяющую получить из дифференцированной ткани корня моркови целое новое растение (рис. 9.17). Из корня моркови изолировали маленькие кусочки

флоэмы и вращали в больших колбах, содержащих молоко кокосового ореха (которое на самом деле является его жидким эндоспермом). Оно содержит различные факторы и питательные вещества, необходимые для роста растений, а также гормоны, необходимые для их дифференцировки. В этих условиях клетки флоэмы делятся и формируют неорганизованную ткань, называемую **каллусом**. Непрерывное вращение вызывает выталкивание отдельных клеток из каллуса в суспензию. Из этих единичных суспендированных клеток образуются корнеподобные узелки, которые продолжают расти все время, пока остаются в суспензии. Если эти узелки перенести на среду, уплотненную агаром, то из них развиваются остальные части растения; в конце концов образуются целые растения моркови, способные к размножению (Steward et al., 1964; Steward, 1970).

Весь процесс развития от единичной клетки до цветущего растения в условиях вращающейся культуры наблюдать невозможно, однако Вазил и Хильдебрандт (Vasil, Hildebrandt, 1965) проследили эти события, изолировав единичные клетки табака и наблюдая за их развитием или непосредственно, или с помощью пейтраферной киносъемки. Как и из клеток моркови, из клеток табака образовывались растеньица, которые могли расти и давать семена.

Клетки табака дают нам еще один пример тотипотентности ядер. Все гены, необходимые для образования целого растения, имеются в ядре дифференцированной клетки. Однако растения и животные развиваются по-разному. Вегетативное размножение отводками (т.е. частями растения, которые, получая питательные вещества, регенерируют недостающие части) представляет собой обычный прием в практике сельского хозяйства. В отличие от животных (у которых половые клетки обособляются

очень рано в развитии в виде отчетливой клеточной линии) у растений в норме гаметы образуются из соматических клеток. Поэтому нет ничего удивительного в том, что единичная клетка может давать

начало другому типу клеток и сформировать генетически однородный клон (от греч. klon, что означает «ветвь»).

Итак, мы можем сделать вывод, что дифференциальная утрата генов не является причиной дифференцировки. Ядра дифференцированных клеток содержат большую часть, а возможно, и все гены зиготы; эти гены экспрессируются в соответствующих условиях. Следовательно, процесс дифференцировки включает в себя селективную экспрессию разных частей генома. Нам предстоит более глубокое исследование проблемы постоянства генома и дифференциальной экспрессии генов с привлечением методов молекулярной биологии и клонирования генов. В следующей главе обсуждение этой проблемы будет продолжено на уровне современной молекулярной биологии.

ЛИТЕРАТУРА

- Beermann W. (1952). Chromosomen Konstanz und spezifische modifikationen der Chromosomenstruktur in der Entwicklung und Organdifferenzierung von *Chironomus tentans*. *Chromosoma* **5**, 139–198.
- Briggs R. (1979). Genetics of cell type determination. *Int. Rev. Cytol.* [Suppl.] **9**, 107–127.
- Briggs R., King T.J. (1952). Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **38**, 455–463.
- Burkholder G.D. (1976). Whole mount electron microscopy of polytene chromosome from *Drosophila melanogaster*. *Can. J. Genet. Cytol.* **18**, 67–77.
- Deuchar E.M. (1975). *Xenopus*: The South African Clawed Frog. Wiley-Interscience, New York.
- DiBerardino M.A. (1987). Genomic potential of differentiated cells analyzed by nuclear transplantation. *Am. Zool.* **27**, 623–644.
- DiBerardino M.A., King T.J. (1967). Development and cellular differentiation of neural nuclear transplants of known karyotypes. *Dev. Biol.* **15**, 102–128.
- Dumont J.N., Yamada T. (1972). Dedifferentiation of iris epithelial cells. *Dev. Biol.* **29**, 385–401.
- Fischberg M., Blackler A.W. (1961). How cells specialize. *Sci. Am.* **205**(3), 124–170.
- Fristrom J.W., Raikow R., Petri W., Stewart D. (1969). In vitro evagination and RNA synthesis in imaginal discs of *Drosophila melanogaster*. In: E.W. Hanley (ed.), *Problems in Biology: RNA in Development*. University of Utah Press, Salt Lake City, pp. 381–402.
- Gehring W.J. (1969). Problems of cell differentiation in *Drosophila*. In: E.W. Hanley (ed.), *Problems in Biology: RNA in Development*. University of Utah Press, Salt Lake City, pp. 231–244.
- Gurdon J.B. (1962). The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelial cells of feeding tadpoles. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **10**, 622–640.
- Gurdon J.B. (1968). Transplanted nuclei and cell differentiation. *Sci. Am.* **219**(6), 24–35.
- Gurdon J.B. (1977). Egg cytoplasm and gene control in development. *Proc. R. Soc. Lond. [Biol.]* **198**, 211–247.
- Gurdon J.B., Laskey R.A., Reeves O.R. (1975). The developmental capacity of nuclei transplanted from keratinized cells of adult frogs. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **34**, 93–112.
- Gurdon J.B., Uehlinger V. (1966). "Fertile" intestinal nuclei. *Nature* **210**, 1240–1241.
- Hadorn E. (1968). Transdetermination in cells. *Sci. Am.* **219**(5), 110–120.
- Hennen S. (1970). Influence of spermine and reduced temperature on the ability of transplanted nuclei to promote normal development in eggs of *Rana pipiens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **66**, 630–637.
- Judd G.H., Young M.W. (1973). An examination of the one cistron-one chromomere concept. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **38**, 573–579.
- King T.J. (1966). Nuclear transplantation in amphibia. *Methods Cell Physiol.* **2**, 1–36.
- King T.J., Briggs R. (1956). Serial transplantation of embryonic nuclei. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **21**, 271–289.
- Markert C.L., Ursprung H. (1971). *Developmental Genetics*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
- McGrath J., Solter D. (1983). Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science* **220**, 1300–1302.
- McGrath J., Solter D. (1984). Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development in vitro. *Science* **226**, 1317–1319.
- McKinnell R.G. (1978). *Cloning: Nuclear Transplantation in Amphibia*. University of Minnesota Press, Minneapolis.
- Orr N.H., DiBerardino M.A., McKinnell R.G. (1986). The genome of frog erythrocytes displays centuplicate replications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 1369–1373.
- Reyer R.W. (1954). Regeneration in the lens in the amphibian eye. *Q. Rev. Biol.* **29**, 1–46.
- Smith L.D. (1956). Transplantation of the nuclei of primordial germ cells into enucleated eggs of *Rana pipiens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **54**, 101–107.
- Steward F.C. (1970). From cultured cells to whole plants: The induction and control of their growth and morphogenesis. *Proc. R. Soc. Lond. [Biol.]* **175**, 1–30.
- Steward F.C., Maples M.O., Smith J. (1958). Growth and organized development of cultured cells. I. Growth and division of freely suspended cells. *Am. J. Bot.* **45**, 693–703.
- Steward F.C., Maples M.O., Kent A.E., Holsten R.D. (1964). Growth and development of cultured plant cells. *Science* **143**, 20–27.
- Swanson C.P., Merz T., Young W.J. (1981). *Cytogenetics: The Chromosome in Division, Inheritance, and Evolution*, 2nd Ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
- Tjio J.H., Puck T.T. (1958). The somatic chromosomes of man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **44**, 1229–1277.
- Ursprung H., Smith K.D., Sofer W.H., Sullivan D.T. (1968). Assay systems for the study of gene function. *Science* **160**, 1075–1081.
- Vasil V., Hildebrandt A.C. (1965). Differentiation of tobacco plants from single isolated cells in microcultures. *Science* **150**, 889–892.
- Wabl M.R., Brun R.B., DuPasquier L. (1975). Lymphocytes of the toad *Xenopus laevis* have the gene set for promoting tadpole development. *Science* **190**, 1310–1312.
- Willadsen S.M. (1986). Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* **320**, 63–65.
- Yamada T. (1966). Control of tissue specificity: The pattern of cellular synthetic activities in tissue transformation. *Am. Zool.* **6**, 21–31.

Глава 10

Тождество геномов и дифференциальная экспрессия генов: молекулярные исследования

Ищи простоту и не верь ей.

АЛЬФРЕД НОРТ УАЙТХЕД (1919)

Для такого исследования необходимо изолировать и накопить в большом количестве не клеточные ядра и даже не отдельные хромосомы, а определенные части определенных хромосом из определенных клеток; только тогда химик сможет анализировать [наследственный материал] более углубленно, чем морфолог.

ТЕОДОР БОВЕРИ (1904)

Введение

Эмбриологи задавались вопросом, идентичны ли наборы генов в клетках разного типа одного и того же организма тому набору генов, который содержится в зиготе? Молекулярные биологи интересовались аналогичным вопросом: не является ли ДНК в клетках разного типа одинаковой, несмотря на различия в белках, синтезируемых этими клетками? Проблема осталась той же, но технические приемы, используемые для ее решения, усложнились. Вместо анализа отдельных органов или зародышей мы можем теперь рассмотреть индивидуальные последовательности ДНК и выяснить, присутствуют ли в клетках одни и те же гены и участвуют ли они в активном синтезе РНК. Прежде чем продолжить рассмотрение этой проблемы, нам следует познакомиться с методами молекулярной биологии.

Методы молекулярной биологии

Гибридизация нуклеиновых кислот

Современные представления о генах эукариот и их РНК-продуктах были сформулированы главным образом на основе опытов по **гибридизации нуклеиновых кислот**. Методика гибридизации включает отжиг одноцепочечных фрагментов РНК и ДНК, позволяющий комплементарным цепям обра-

зовывать двухцепочечные гибриды. Например, если нуклеиновые кислоты разрезаны на небольшие фрагменты и каждый фрагмент диссоциирован на отдельные нити (т.е. денатурирован), то каждая нить по прошествии достаточного времени может найти комплементарного партнера и соединиться с ним. Условия ренатурации должны быть таковы, чтобы специфические гибриды комплементарных цепей сохранялись, а неспецифические гибриды диссоциировали. Обычно эти условия обеспечиваются изменением температуры или ионной силы раствора, в котором проходит ренатурация (Wetmur, Davidson, 1968).

Сходным образом следует ожидать, что РНК, синтезируемая на каком-либо участке ДНК, будет связываться с цепью, на которой она синтезирована. Таким образом, предполагается, что РНК специфически гибридизуется с геном, который ее кодирует. Для определения уровня гибридизации одну из цепей нуклеиновой кислоты обычно метят радиоактивным изотопом. Возьмем для примера один эксперимент. Нерadioактивную ДНК из печени лягушки можно денатурировать (ее цепи разделяются в щелочи) и иммобилизовать на нитроцеллюлозном фильтре. Радиоактивную РНК можно получить при введении радиоактивных предшественников РНК в другую лягушку или в культуру клеток лягушки.

Затем выделяют рибосомы и экстрагируют из них радиоактивную рибосомную 28S-РНК (рРНК), которую добавляют к фильтрам с ДНК. Полагают, что радиоактивная РНК будет связываться только с теми участками ДНК, которые содержат гены для 28S-рРНК. Количество связавшейся РНК можно определить, измерив радиоактивность фильтров после удаления несвязавшейся РНК.

Схема такого опыта и его результаты показаны на рис. 10.1. ДНК выделяли из нормальных головастиков с двумя ядрышками на клетку, а также из гомозиготных мутантов, полностью лишенных ядрышек, и гетерозиготных головастиков с одним ядрышком на клетку (Wallace, Birnstiel, 1966). ДНК, выделенную из каждой группы, денатурировали. По 50 мкг ДНК наносили на каждый из нескольких десятков бумажных фильтров: в одной группе фильтров – денатурированная ДНК из головастиков дикого типа; во второй – ДНК из мутантных головастиков; в третий – ДНК из гетерозиготных головастиков. Затем различные количества радиоактивной 28S-рРНК гибридизовали с тремя типами ДНК на фильтрах. На одни фильтры наносили небольшие количества радиоактивной ДНК, на другие – большие количества. Оказалось, что радиоактивная рРНК хорошо связывается с ДНК из нормальных головастиков, насыщая в конечном счете всю доступную ДНК. С ДНК из клеток головастиков, лишенных ядрышек, рРНК не связывалась, тогда как ДНК из гетерозиготных головастиков связывала лишь половину того количества рибосомной РНК, которое связывалось с ДНК из нормальных головастиков. Таким образом, было показано, что гены 28S-рРНК в геноме головастиков транскрибируются в области ядрышек.

Одна из технических трудностей, связанных с гибридизацией нуклеиновых кислот, заключается в сложности получения молекул РНК с высокой радиоактивностью. Это затруднение можно преодолеть с помощью выделения РНК и получения комплементарной ДНК-копии (кДНК) в присутствии радиоактивных предшественников. Она может быть синтезирована в пробирке, содержащей РНК, короткий фрагмент ДНК, называемый праймером (затравкой), радиоактивные предшественники ДНК и вирусный фермент – обратную транскриптазу. Этот фермент способен синтезировать ДНК на РНК-матрице (рис. 10.2). Поскольку ДНК синтезируется *in vitro*, проблем с разведением радиоактивных предшественников не возникает. Кроме того, такая кДНК может гибридизоваться как с геном, синтезирующим РНК (хотя и с некодирующей цепью), так и с самой РНК. Это оказывается чрезвычайно полезным при регистрации небольших количеств специфических РНК.

Клонирование генов

Сравнительно недавно, используя методы гибридизации нуклеиновых кислот, биологам развития на основе подхода, названного клонированием генов, удалось выделить отдельные гены. Если бы кто-то захотел изолировать, например, отдельный ген человека, то он столкнулся бы с неразрешимыми проблемами. Геном человека содержит ДНК в количестве, достаточном для кодирования примерно 2×10^5 генов размером около 15 000 пар оснований каждый. Обычные биохимические процедуры не позволяют отделить один ген от всех остальных. Однако техника клонирования генов позволяет выделить специфические участки ДНК, а также провести их амплификацию до огромного числа копий.

Первый этап в этой процедуре заключается в разрезании ядерной ДНК на различные фрагменты. Это осуществляется с помощью инкубации ДНК в присутствии **рестрикционной эндонуклеазы** (обычно называемой «рестриктазой»). Эти эндонуклеазы являются, как правило, бактериальными ферментами, которые узнают специфические последовательности ДНК (табл. 10.1) и расщепляют ДНК в этих участках (Nathans, Smith, 1975). Например, если ДНК человека инкубируют с ферментом *Bam*HI (выделенным из *Bacillus amyloliquefaciens*, штамм H), то ДНК разрезается в каждом участке, где имеется последовательность ГГАТЦЦ. Продуктом реакции являются различные по длине фрагменты ДНК, содержащие Г на одном конце и ГАТЦЦ на другом (рис. 10.3).

Следующий этап – включение полученных фрагментов ДНК в **векторы для клонирования**. Эти векторы представляют собой кольцевые молекулы ДНК, которые реплицируются в бактериальных клетках независимо от бактериальной хромосомы. Обычно используются плазмиды, устойчивые к тем или иным лекарственным препаратам, или специально модифицированные вирусы, которые особенно эффективны в случае клонирования больших фрагментов ДНК. Подобную плазмиду можно сконструировать таким образом, чтобы она содержала только один чувствительный к *Bam*HI сайт. Ее можно раскрыть при инкубации с данной рестриктазой. После раскрытия она смешивается с фрагментированной ДНК. Во многих случаях нарезанные фрагменты ДНК оказываются включенными в векторы благодаря комплементарности их концов открытым концам вектора. Затем эти фрагменты могут соединяться ковалентно в растворе, содержащем фермент **ДНК-лигазу**. Итогом всей процедуры являются бактериальные плазмиды, каждая из которых содержит одиночный фрагмент ДНК человека. Их называют **рекомбинантными плазмидами** или просто **рекомбинантной ДНК** (Cohen et al., 1973; Blattner et al., 1978).

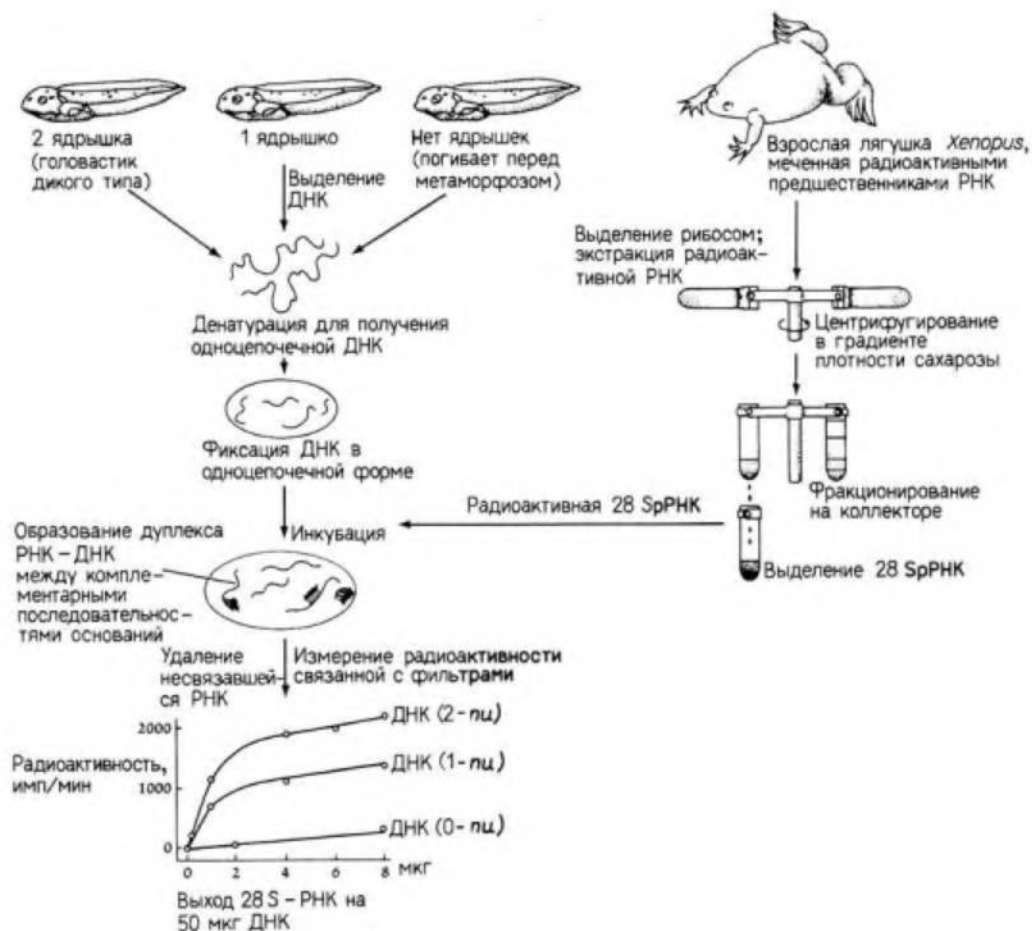


Рис. 10.1. Опыт по гибридизации нуклеиновых кислот, из которого становится ясно, что ядрышко кодирует рибосомную 28S-РНК. Из содержащих 2, 1 и 0 ядрышек клеток головастика экстрагировали по отдельности ДНК. Полученную ДНК денатурировали (делали одноцепочечной) и определенное количество одноцепочечной ДНК запекали на нитроцеллюлозных фильтрах. Одновременно из клеток взрослых лягушек получали радиоактивную 28S-рРНК путем выделения рибосом и последующего разделения трех основных видов РНК. Радиоактивную 28S-рРНК инкубировали на ДНК-содержащих фильтрах в условиях, когда она могла присоединяться к комплементарным участкам ДНК. Затем измеряли радиоактивность фильтров в сцинтилляционном счетчике.

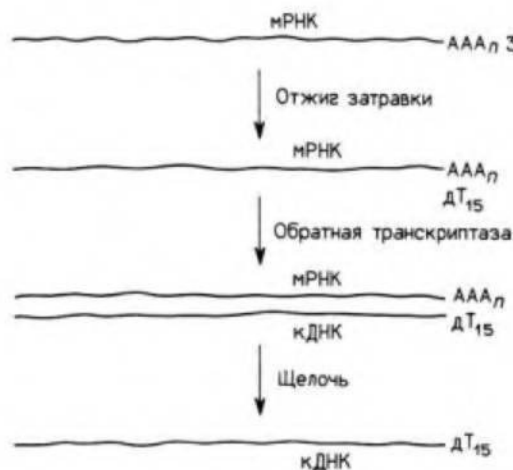


Рис. 10.2. Метод получения комплементарной ДНК (кДНК). Большая часть информационных РНК (мРНК) содержит протяженную последовательность из остатков аденозина (AAA_n) на 3'-конце молекул (см. гл. 11); поэтому, экспериментаторы гибридизуют «затравку», состоящую из 15 остатков дезокситимидина (dT_{15}), с 3'-концом мРНК. Затем с помощью обратной транскриптазы синтезируют комплементарную цепь ДНК, начиная от затравки dT_{15} . кДНК можно выделить с помощью повышения pH раствора, что вызывает денатурацию двухцепочечного гибрида и деградацию РНК.

Таблица 10.1. Широко используемые рестриктазы

Фермент	Источник	Сайт узнавания и расщепления ¹
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i>	GAATTC CTTAAG
<i>BamHI</i>	<i>Bacillus amyloliquifaciens</i>	GTATCC CTAGG
<i>HindIII</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	AAGCTT TTCTAA
<i>SalI</i>	<i>Streptomyces albus</i>	GTGAAC CACTG
<i>SmaI</i>	<i>Serratia marcescens</i>	CCCGGG GGGCCC
<i>HhaI</i>	<i>Haemophilus haemolyticus</i>	GCCT ACG
<i>HaeIII</i>	<i>Haemophilus aegyptius</i>	GGCC CCGG
<i>AluI</i>	<i>Arthrobacter luteus</i>	AGCT TCTA

¹ Все сайты узнавания рестриктаз имеют центральную симметрию. Двухцепочечная последовательность, прочитанная в одном направлении, идентична последовательности, прочитанной в обратном направлении.

На рис. 10.3 показана плазмида pBR322, которая часто используется молекулярными биологами в качестве клонирующего вектора. Она несет два гена устойчивости к антибиотикам — *tc^R*, который обеспечивает устойчивость к тетрациклину, и *Ap^R*, который делает бактерии устойчивыми к ампициллину. Эти гены устойчивости к антибиотикам, столь нежелательные для медиков, становятся незаменимыми для генных инженеров, поскольку один из *BamHI*-сайтов в этой плазмиде расположен в середине гена *tc^R*. Предполагаемые рекомбинантные плазмиды, полученные описанным ранее способом, затем инкубируют с клетками *E. coli* дикого типа, чувствительными к обоим антибиотикам, в условиях, позволяющих бактериям захватить эти плазмиды. При этом не каждая бактерия включает плазмиду и не каждая плазмида включает чужеродный ген, т.к. липкие концы плазмиды в сайте рестрикции могут ренатурировать друг с другом. Для отбора тех бактерий, которые включили плазмиды, обработанные клетки *E. coli* выращивают на агаре в присутствии ампициллина. При этом выживают только те бактерии, которые включили плазмиды. Затем часть каждой жизнеспособной колонии переносится на агар, содержащий тетрациклин. Если бактерии продолжают рост, то, следовательно, ген *tc^R* плазмиды остался интактным и эта плазмида восстановилась в результате простого соединения собственных концов друг с другом. Если бактерии, выросшие на

среде с ампициллином, не выживают на среде с тетрациклином, то ген устойчивости к тетрациклину в плазмиде уже не функционирует. Это означает, что ген *tc^R* разорван фрагментом фермента рестрикции из чужого генома. Со среды, содержащей ампициллин, отбираются те колонии, которые не росли на среде, содержащей тетрациклин. Эти колонии следует проверить на присутствие определенного гена.

Клетки из каждой колонии *E. coli*, содержащей рекомбинантные плазмиды, помещают на нитроцеллюлозный фильтр. После лизиса клеток клеточная ДНК присоединяется к фильтру. Затем цепи ДНК разделяют с помощью нагревания и инкубируют фильтр в растворе, содержащем радиоактивную РНК (или ее кДНК-копию) для гена, выбранного для клонирования. Если плазмида содержит этот ген, то ДНК этого гена должна присутствовать на бумаге и только эта ДНК обладает способностью присоединять радиоактивную РНК или кДНК. Именно поэтому соответствующие места фильтра окажутся радиоактивными. Радиоактивность этих участков регистрируется с помощью радиоавтографии. Для этого чувствительная рентгеновская пленка помещается поверх обработанной бумаги. Электроны с высокой энергией, излучаемые радиоактивной РНК, сенсibiliзируют зерна серебра в пленке, вызывая их потемнение при последующем проявлении. В результате над каждой колонией, содержащей рекомбинантную плазмиду с определенным геном, образуется темное пятно (рис. 10.3). Эти колонии изолируют и выращивают вновь. В итоге можно получить многие триллионы клеток, каждая из которых содержит сотни рекомбинантных плазмид.

Рекомбинантные плазмиды можно отделить от хромосомы *E. coli* с помощью центрифугирования. Фрагмент ДНК человека, содержащий интересующий нас ген, высвобождается при инкубации плазмид с *BamHI*. Этот фрагмент затем отделяют от плазмидной ДНК. Таким образом, экспериментатор получает микрограммы очищенной ДНК, содержащей определенный ген. [Хотя описанная процедура выглядит вполне логичной и простой, число колоний, которые следует скринировать, достигает часто астрономических чисел. Число случайных фрагментов, которые должны быть клонированы, для того чтобы получить интересующий вас ген, возрастает с увеличением сложности генома организма¹. Чтобы клонировать с 99%-ной надежностью желаемый ген из *E. coli*, необходимо проанализировать примерно 1500 колоний. Для млекопитающих это число возрастет до 800 000; вместо

¹ Сложность в данном случае определяется числом генов различного типа, содержащихся в клеточном ядре.

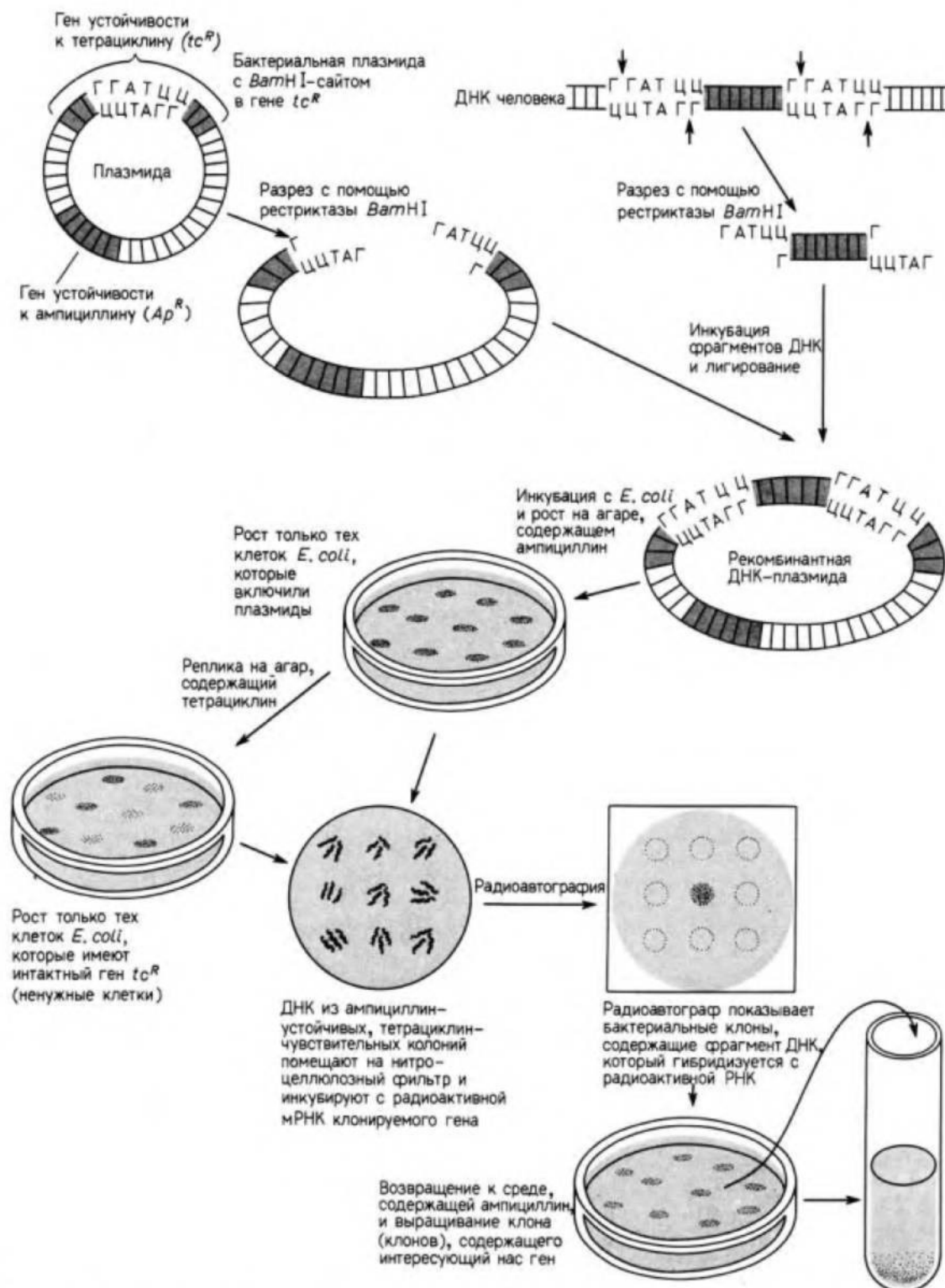


Рис. 10.3. Стандартная схема клонирования ДНК. В качестве примера используется введение последовательности ДНК человека в плазмиду с одним Bam HI-чувствительным сайтом.

того чтобы выращивать бактерии в стандартных чашках Петри, колонии зачастую выращивают на подносах из кафетериев (Blattner et al., 1978; Slightom et al., 1980).]

При альтернативном методе клонирования в качестве исходного материала используется цитоплазматическая РНК, а не геномная ДНК. Как показано на рис. 10.2, можно получить цепи ДНК, комплементарные цепям мРНК. На следующем этапе процедуры одноцепочечную ДНК с помощью ДНК-полимеразы можно перевести в двухцепочечную. Полученные цепи ДНК после присоединения к ним подходящих «концов» могут быть встроены в плазмиды. Пришивка фрагментов ГАТЦ/Г к срезынным концам фрагмента ДНК создает искусственный рестрикционный *Bam*HI-сайт и позволяет

фрагменту ДНК самостоятельно встроиться в плазмиду, разрезанную ферментом.

Такие коллекции клонов, полученных из мРНК, называют обычно **библиотеками**. Можно, например, получить библиотеку для печени мыши, которая будет содержать гены, участвующие в синтезе белков печени. Можно также получить библиотеку для вегетативного полушария ооцита *Xenopus*, которая будет представлять мРНК, содержащуюся только в этой части клетки. Полученные подобным образом гены представляют значительный интерес, поскольку они не содержат интронов. После добавления к бактериальным клеткам эти гены могут транскрибироваться и затем транслироваться в кодируемые ими белки.

Дополнительные сведения и гипотезы

Когда ген клонирован...

... предстоит еще проделать большую работу. В последующих главах будет наглядно показано, что клонированные гены революционизировали наши представления о развитии. Некоторые методы использования рекомбинантных ДНК описаны ниже.

Секвенирование

Результаты секвенирования дают нам представление о структуре кодируемого белка и позволяют идентифицировать регуляторные последовательности ДНК, общие для ряда генов. (Например, в следующей главе мы увидим, что все гены, регулируемые гормоном прогестероном, содержат почти одинаковые последовательности ДНК вблизи начала участков, кодирующих белок.) Простота метода секвенирования с d_2 НТФ (Sanger et al., 1977) сделала этот метод обычным для многих молекулярно-биологических лабораторий. С использованием фага или плазмиды, несущих клонированный ген, выделяют одну цепь кольцевой ДНК (рис. 10.4). Затем гибридизуют радиоактивную ДНК-затравку (примерно из 20 нуклеотидов), которая комплементарна фаговой ДНК в области, непосредственно примыкающей к 5'-концу клонированного гена. (Так как эти последовательности известны, олигонуклеотидные затравки могут быть легко синтезированы или получены из коммерческих источников.) Затравка имеет свободный 3'-конец, к которому можно добавить дополнительные нуклеотиды. ДНК с затравкой и все четыре дезоксирибонуклеозидтрифосфата помещают в четыре пробирки. Каждая из

пробирок содержит полимеризующую субъединицу ДНК-полимеразы и один из дидезоксирибонуклеозидтрифосфатов: одна пробирка содержит дидезокси-Г, другая – дидезокси-А и т. д. Структура дезокси- и дидезоксинуклеотидов представлена на рис. 10.5. Если дезоксинуклеотид лишен гидроксильной (ОН) группы при атоме углерода в 2'-положении сахара, то дидезоксинуклеотид лишен гидроксильных групп при атомах углерода в двух положениях – 2' и 3'. Поэтому, хотя дидезоксинуклеотид может присоединяться ДНК-полимеразой к растущей цепи ДНК, он останавливает дальнейший рост цепи, поскольку из-за отсутствия 3'-гидроксильной группы к нему не может присоединиться новый нуклеотид. Если ДНК-полимераза синтезирует ДНК от затравки, то новообразованная ДНК будет комплементарна клонированному гену. В пробирке с дидезокси-А каждый раз, когда ДНК-полимераза присоединяет А к растущей цепи, существует возможность, что вместо дезокси-А будет присоединен дидезокси-А. В том случае, когда это происходит, рост цепи останавливается. Аналогичным образом в пробирке с дидезокси-Г рост цепи с некоторой вероятностью останавливается каждый раз, когда присоединяется Г. (Все это напоминает греческий народный танец, где лишь небольшая группа из потенциальных танцоров одновременно участвуют в танце.) Поскольку в каждой пробирке синтезируются миллионы цепей, каждая пробирка будет содержать популяцию цепей, синтез которых остановлен в первом из возможных положений, в последнем и, наконец, – в промежуточных положениях. Например, пробирка с дидезокси-А будет содержать

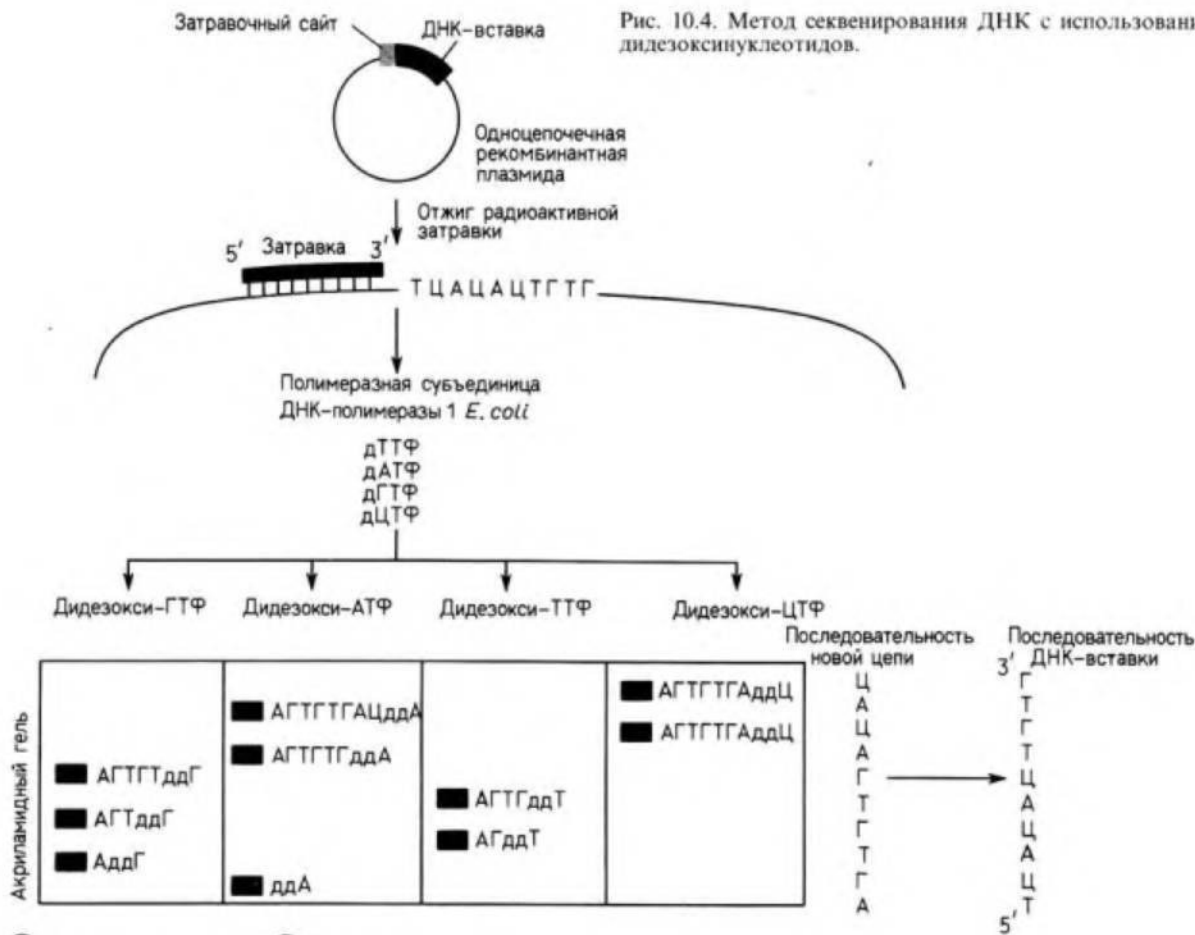


Рис. 10.4. Метод секвенирования ДНК с использованием дидеозисинуклеотидов.

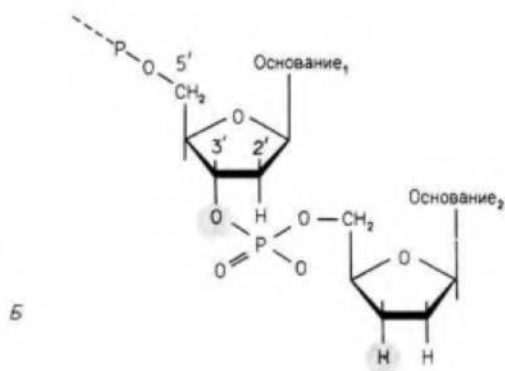
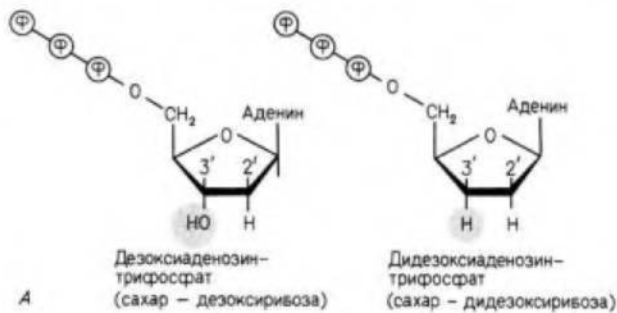


Рис. 10.5. Сравнение дезокси- и дидеозисинуклеотидов. А. Структуры нуклеотидов обоих типов. Б. 3'-конец цепи, которая была терминирована включением дидеозисинуклеотида, поскольку он не содержит 3'-гидроксильную группу, необходимую для дальнейшей полимеризации ДНК.



Рис. 10.6. Пример секвенирования ДНК с помощью дидеокси-метода. (С любезного разрешения G. Guild.)

цепи различной дискретной длины, каждая из которых оканчивается остатком А.

Полученные радиоактивные фрагменты ДНК разделяют с помощью **электрофореза**. Смеси фрагментов вносят в лунки на одной стороне геля и затем пропускают через гель электрический ток. Отрицательно заряженные фрагменты ДНК мигрируют в направлении положительного полюса, при этом меньшие по размеру фрагменты движутся быстрее, чем крупные. Фрагменты с наименьшим числом нуклеотидов движутся быстрее, чем фрагменты с большим числом нуклеотидов (рис. 10.4 и 10.6). Прочитывая наборы полос, определяют последовательность ДНК, комплементарную клонированному гену.

Перенос генов

Во многих случаях желательно получить ген, модифицировать его и затем вернуть в эукариотический организм. Это осуществляется с помощью **трансфекции** – метода, посредством которого фрагменты ДНК можно ввести в хромосомную ДНК клетки. Клонированную ДНК смешивают с селективным маркерным геном (таким, как ген *тимидинкиназы* вируса *Herpes simplex*) и высокополимерной ДНК из какого-либо другого организма. Эту смесь инкубируют с фосфатом кальция; при

этом образуются ДНК-содержащие кристаллы, которые фагоцитируются клетками в культуре. В случае дефицитных по тимидинкиназе клеток можно вырастить культуру в условиях, обеспечивающих выживание лишь тех клеток, которые захватили кристаллы ДНК-фосфат кальция (и потому экспрессируют ген тимидинкиназы) (Perucho et al., 1980; Robins et al., 1981). На рис. 10.7 показан опыт, в котором глобиновые гены человека смешивали с геном тимидинкиназы вируса *Herpes* и большими фрагментами ДНК хомячка. Селекция колоний на



Рис. 10.7. Трансфекция ДНК глобинового гена из генома одного вида в геном другого вида. Клонированные глобиновые гены человека, маркерный ген (ген тимидинкиназы), позволяющий проводить селекцию, и протяженные фрагменты ДНК из генома другого вида соосаждаются в виде кристаллов в фосфате кальция. Кристаллы, содержащие ДНК, захватываются клетками, и при соответствующих внутриклеточных условиях ДНК интегрируется в хромосомы клеток-хозяев. (По Watson et al., 1983.)

присутствие тимидинкиназы выявила наличие в хромосоме мыши многочисленных глобиновых генов человека, чередующихся с ДНК хомячка (Watson et al., 1983). Недавно аналогичный метод был использован для переноса генов в стволовые клетки эмбриональной карциномы мыши. Эти стволовые клетки можно интегрировать в зародышей мыши, где из них впоследствии образуется часть тканей взрослой мыши (гл. 6). При последующем спаривании таких мышей новые гены могут попадать в каждую клетку их потомства (Gossler et al., 1986).

Эффективность метода переноса с фосфатом кальция довольно низка, поэтому были разработаны другие методы. Один из них состоит в микроинъекции ДНК непосредственно в ядро (или пронуклеус) клетки (Saracchi, 1980; рис. 10.8). При хорошем навыке и специальном оборудовании можно инъецировать около 1000 клеток за час (в удачный день); при этом до 50% инъецированной ДНК интегрируется в хромосомы клеток. Этот метод был использован для введения генов β -цепи глобина человека в зиготы мыши, дефицитные по β -цепям. Развившиеся из этих зигот мыши имели функционирующие гены β -цепи глобина человека, компенсировавшие генетическое заболевание (Constantini et al., 1986).

Относительно новым методом является использование ретровирусных векторов. Ретровирусы — это РНК-содержащие онкогенные вирусы. Внутри клетки-хозяина они синтезируют свою ДНК-копию (используя собственную обратную транскриптазу); затем копия переводится в двухцепочечную форму и интегрируется в хромосому хозяина. Эта интеграция осуществляется благодаря присутствию двух идентичных последовательностей (длинных концевых повторов) на концах ДНК. Ретровирусные векторы получены при помощи удаления генов, обеспечивающих упаковку вируса, из центральной части ретровируса мыши. Благодаря такому удалению создается свободный участок, куда можно поместить другие гены. Гены, которые были клонированы в плазмидах, могут быть выделены из них (с помощью подходящей рестриктазы) и встроены в ретровирусные векторы. Часть этого участка может быть занята селективным маркером (таким, как тимидинкиназа вируса *Herpes simplex*). Такие ретровирусные векторы инфицируют клетки мыши с эффективностью, достигающей 100%. Мышь со стабильными генами, полученными от других организмов (с помощью микроинъекции, вирусной инфекции или включения модифицированных стволовых клеток эмбриональной карциномы), называют трансгенной мышью.

ДНК- и РНК-блоттинг

ДНК- и РНК-блоттинг

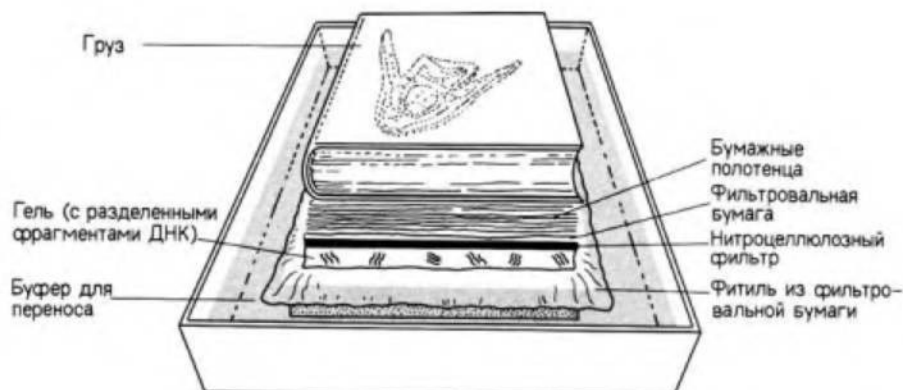
ДНК-блоттинг (называемый также **Саузерн-блоттингом** или гибридизацией по Саузерну) представляет собой метод для выявления определенного гена (Sauthern, 1975) с последующим изучением его функций. С помощью ретровирусного вектора ген фактора, стимулирующего образование колоний гранулоцитов и макрофагов (КСФ-г.м), вводили в клетки, которые в обычных условиях не синтезируют этот фактор, но чувствительны к нему (Lang et al., 1985). Некоторые из клеток, обработанных рекомбинантным вирусом, начинали неконтролируемый рост, образуя после пересадки в мышь злокачественные опухоли. Получили ли все эти клетки дополнительные копии гена КСФ-г.м? Транскрибируют ли эти дополнительные гены мРНК для КСФ-г.м? На первый из этих вопросов ответ был получен с помощью ДНК-блоттинга.

Ланг и его коллеги выделяли ДНК из клеток полученных злокачественных колоний и обрабатывали ее рестриктазой. Затем фрагменты ДНК разделяли с помощью электрофореза в геле. Помещая гель с фрагментами ДНК в раствор щелочи, добивались денатурации ДНК до отдельных цепей. После нейтрализации гель переносили на влажную фильтровальную бумагу на подложке из пластика (рис. 10.9). Нитроцеллюлозный фильтр (способный связывать одноцепочечную ДНК) помещали прямо на гель и накрывали его несколькими слоями бумажных полотенец. Края фильтровальной бумаги, лежащей под гелем, были опущены в сосуд с буфером высокой ионной силы. Буфер поднимался через гель и далее через нитроцеллюлозный фильтр и полотенца. При этом ДНК задерживалась на нитроцеллюлозном фильтре. После запекания ДНК на фильтре (иначе произойдет ее утечка) фрагменты



Рис. 10.8. Инъекция ДНК в ядро (в данном случае — в пронуклеус яйцеклетки мыши). (Из Wagner et al., 1981; фотография с любезного разрешения Т.Е. Wagner.)

Рис. 10.9. Аппарат для Саузерн-блоттинга. Буфер для переноса проходит через гель, нитроцеллюлозу и бумажные полотенца благодаря капиллярному эффекту, захватывая с собой ДНК. Однопочечная ДНК задерживается нитроцеллюлозным фильтром. Положение ДНК на фильтре отражает положение фрагментов ДНК в геле.



ДНК инкубировали с радиоактивной кДНК к соответствующему гену (можно использовать также и мРНК). Радиоавтограф нитроцеллюлозного фильтра показал, где радиоактивная ДНК нашла себе комплементарную ДНК. В итоге Ланг с коллегами показали (рис. 10.10), что помимо двух обычных генов мыши, продуцирующих КСФ-г,м и расположенных в рестрикционном фрагменте длиной 7800 пар оснований, злокачественные клетки имеют ген КСФ-г,м, полученный от вируса (о чем свидетельствует наличие последовательностей вирусной ДНК) и лежащий в рестрикционном фрагменте длиной 5500 пар оснований. Для каждого из клонов злокачественных клеток был получен аналогичный результат.

Экспрессию этих генов можно продемонстрировать с помощью РНК-блота (обычно называемого Нозерн-блотом). В отличие от Саузерн-блота, при котором из геля на бумагу переносят ДНК, при Нозерн-блоте (название не связано с фамилией ис-

следователя) аналогичным образом из геля на бумагу переносят РНК. Нозерн-блоты весьма полезны при изучении накопления специфических мРНК в цитоплазме определенной клетки. В данном случае цитоплазматическую РНК изолируют из злокачественных клеток, инфицированных ретровирусом, содержащим ген КСФ-г,м, и из незлокачественных клеток, инфицированных аналогичным ретровирусом, но лишенным гена КСФ-г,м. РНК из каждого клеточного клона фракционировали в геле и переносили на нитроцеллюлозный фильтр. После инкубации фильтра с кДНК к гену КСФ-г,м было обнаружено, что во всех злокачественных клонах транскрибируется ген КСФ-г,м. Другие клетки его не транскрибируют (рис. 10.11). Ланг с соавторами пришли к выводу, что в клетках транскрибируется искусственно выделенный ген КСФ-г,м, находящийся под контролем вируса. Далее оказалось, что эти клетки, которым требуется КСФ-г,м для роста, приобрели способность синтезировать свой собст-

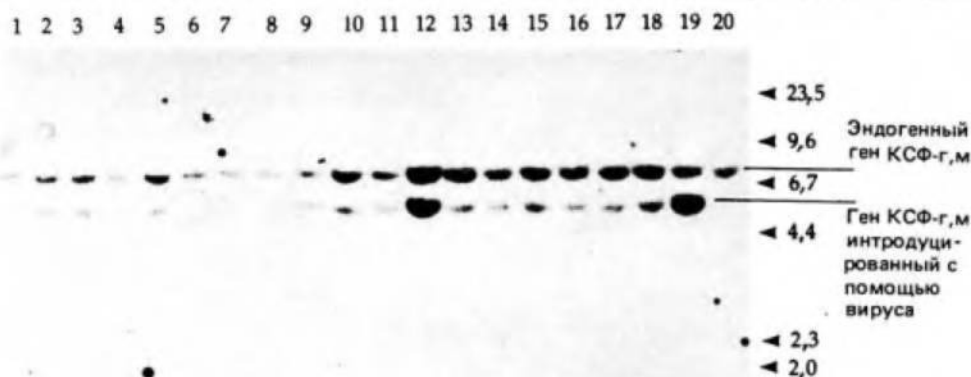


Рис. 10.10. Интеграция ретровируса, содержащего ген КСФ-г,м, в геном клетки мыши. Представлены результаты гибринизации по Саузерну (блот) геномов из 20 клонов. ДНК была выделена из каждого клона, обработана рестриктазой *Sac* I, разделена в геле, подвергнута блоттингу и гибринизована с радиоактивной кДНК к гену КСФ-г,м. Дорожки 2–19 содержат ДНК из злокачественных клеток, инфицированных ретровирусом, содержащим ген КСФ-г,м. Дорожка 1 содержит ДНК из незлокачественного клона, инфицированного аналогичным вирусом без гена КСФ-г,м; дорожка 20 содержит ДНК из неинфицированных зародышей мыши. Верхние зоны представляют ген КСФ-г,м из нормального генома мыши. Нижние зоны представляют ген КСФ-г,м, введенный вирусом. (Из Lang et al., 1985; фотография с любезного разрешения R. A. Lang.)



Рис. 10.11. Обнаружение вирусспецифических мРНК, кодирующих КСФ-г.м. Представлены результаты Нозерн-блоттинга мРНК из 8 клонов клеток, инфицированных ретровирусом, содержащим ген КСФ-г.м. мыши (дорожки 2–9), и двух клонов, инфицированных аналогичным вирусом, лишенным ДНК гена КСФ-г.м (дорожки 10 и 11). Транскрипт, кодируемый вирусом, содержит больше РНК в лидерной последовательности между сайтами инициации транскрипции и трансляции. Поэтому он превосходит по размерам обычную КСФ-г.м мРНК мыши (дорожка 1) и остается в верхней части геля. (Из Lang et al., 1985. Фотография с любезного разрешения R. A. Lang.)

венный КСФ-г.м. Таким образом, они стимулируют себя к непрерывному делению, образуя в конечном счете опухоли. [Это наблюдение подтверждало гипотезу Тодаро и др. (Todaro et al., 1977), которые предсказали подобный феномен в 1977 г. Эти опыты по индукции опухолей будут подробно рассматриваться в гл. 20.]

Одним из важных применений Нозерн-блота является определение времени начала экспрессии какого-либо конкретного гена. Исследователь может выделить препараты РНК из зародышей на различных стадиях развития и разделить их с помощью электрофореза на параллельных дорожках геля. После переноса расфракционированной РНК на нитроцеллюлозный фильтр методом блоттинга фильтр со связанной РНК инкубируют в растворе, содержащем радиоактивный одноцепочечный фрагмент ДНК исследуемого гена. Эта ДНК будет связываться только с теми участками, где находится комплементарная РНК. Таким образом, если мРНК для данного гена присутствует на определенной стадии эмбриогенеза, то радиоактивная ДНК должна связываться с ней и ее можно зарегистрировать с помощью радиоавтографии. Радиоавтографы этого типа называют **Нозерн-блота́ми развития**. На рис. 10.12 показан Нозерн-блот развития для экспрессии гена алкогольдегидрогеназы у *Drosophila*. Можно видеть, что мРНК для этого белка синтезируется на всех стадиях зародышевого развития,

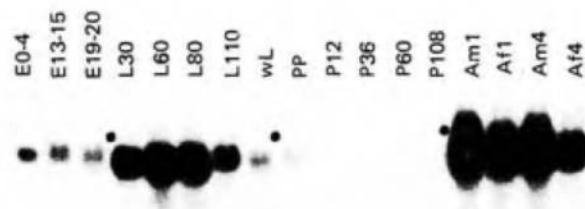


Рис. 10.12. Нозерн-блот для гена алкогольдегидрогеназы в процессе развития *Drosophila melanogaster*. Хромосомная локализация этого гена показана на рис. 9.1. РНК экстрагировали на стадиях зародыша (E), личинки (L), предкуколки (PP), куколки (P), имаго (A) и затем равные количества (5 мкг) вносили в карманы геля. После электрофореза РНК переносили блоттингом на нитроцеллюлозный фильтр и инкубировали в растворе, содержащем одноцепочечный фрагмент ДНК гена алкогольдегидрогеназы. Нозерн-блот показывает, что в ходе эмбриогенеза накапливается незначительное количество РНК этого гена, тогда как в тканях личинки происходит значительное увеличение количества мРНК алкогольдегидрогеназы. Когда личинки начинают окукливаться, в них прекращается накопление этой мРНК. Однако у взрослых особей отмечается высокое содержание этой мРНК. (Из Savakis, Ashburner, 1985.)

кроме стадии куколки, и у взрослой особи (Savakis, Ashburner, 1985).

Сайт-специфичный мутагенез и трансляция разрыва

Одно из наиболее продуктивных приложений методик с использованием рекомбинантных ДНК связано с возможностью изменить конкретный нуклеотид в клонированном гене и затем выяснить, влияет ли это изменение на функционирование гена. Специфическое мутирование осуществляется с помощью олигонуклеотид-направленного **сайт-специфичного мутагенеза**. Для этого сначала определяют последовательность ДНК и искусственно синтезируют олигонуклеотид, который имеет правильную последовательность, за исключением одной (или нескольких) замен. Затем этот олигонуклеотид длиной от 12 до 15 пар оснований смешивают с одноцепочечной рекомбинантной плазмидой, содержащей последовательности кДНК к гену дикого типа. Олигонуклеотид будет гибридизоваться с плазмидой, несмотря на то что одна из его пар оснований некомплементарна. Модифицированный олигонуклеотид можно затем использовать в качестве затравки для репликации оставшейся части плазмиды и клонированной ДНК с помощью ДНК-полимеразы I *E. coli*. Далее концы отреплицированных плазмид связываются ковалентно с помощью ДНК-лигазы и плазмиды вводятся в клетки *E. coli*. Половина реплицирующихся плазмид восстанавливает

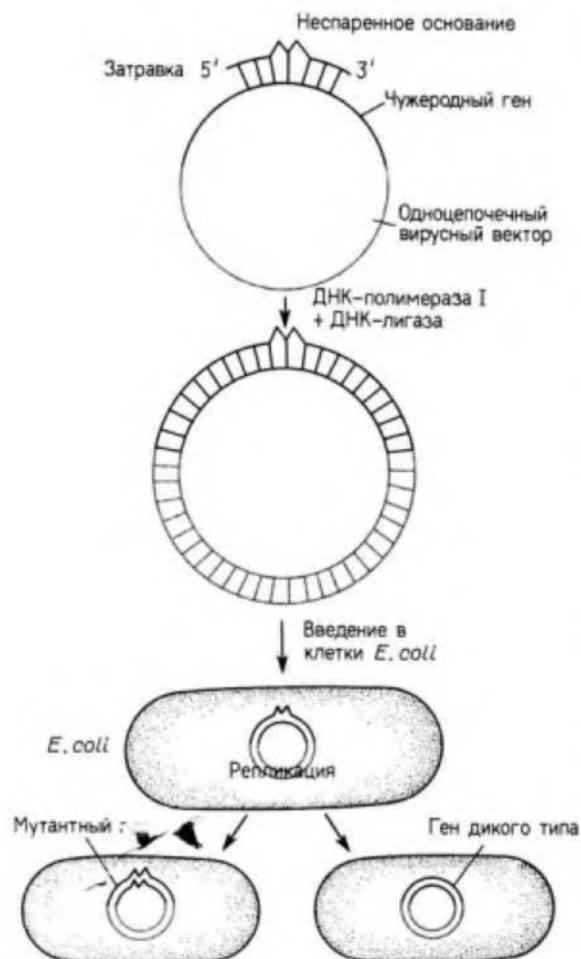


Рис. 10.13. Олигонуклеотид-направленный сайт-специфический мутагенез. Олигонуклеотид с одним замененным основанием гибридизуется с комплементарной цепью клонированной ДНК. Остальная часть цепи может быть синтезирована ДНК-полимеразой I *E. coli*, использующей олигонуклеотид в качестве затравки. Кольцо замыкается ковалентно с помощью лигазы. После введения плазмиды в клетки *E. coli* молекула реплицирует ген дикого типа и мутантный ген. (По Watson et al., 1983.)

Рис. 10.14. Ник-трансляция. Одноцепочечный разрыв (ник) вводится в двухцепочечную ДНК с помощью ДНКазы I. В ходе репарации разрыва ДНК-полимеразой I *E. coli* этот фермент удаляет основания впереди себя. Если в среде присутствуют радиоактивные нуклеозидтрифосфаты, то они могут быть использованы для репарации образующихся брешей. В результате получается цепь ДНК с высокой удельной радиоактивностью. (По International Biotechnologies, Inc. catalogue, 1985.)



последовательность дикого типа, тогда как в половине плазмид возникает мутация с заменой одного основания (рис. 10.13). (Применив дополнительные генетические приемы, можно получить мутантных клонов больше, чем клонов дикого типа.) Мутантные клоны и клоны дикого типа различаются по эффективности гибридизации с точными копиями исследуемого участка (Gillam et al., 1980; Smith, 1985). Мутантный ген может быть изолирован из этих плазмид и транслирован в мутантный белок. Остается выяснить, функционирует ли этот белок, несмотря на замену определенной аминокислоты.

При **трансляции разрыва** (ник-трансляции) также используют ДНК-полимеразу, но несколько иным образом. С помощью этого метода одну из цепей в клонированном гене можно заместить радиоактивными нуклеотидами, создавая таким образом высокорadioактивные образцы для Саузерн-блотов, Нозерн-блотов и гибридизации *in situ*. Клонированный ген изолируют из плазмиды и обрабатывают ДНКазой I в низкой концентрации. Этот фермент надрезает ДНК в случайных местах, образуя свободные 3'-гидроксильные концы, к которым может присоединяться ДНК-полимераза I. Одна из особенностей ДНК-полимеразы I *E. coli* заключается в том, что она добавляет нуклеотиды на одном конце, одновременно удаляя нуклеотиды впереди разрыва (рис. 10.14). В результате происходит «движение» разрыва («трансляция ника») вдоль цепи ДНК (Kelly et al., 1970; Rigby et al., 1977). После замены исходных оснований на радиоактивные удельная радиоактивность фрагментов ДНК может превышать 10^8 имп/мин на 1 мкг ДНК.

Дифференциальная экспрессия генов

Благодаря разработке таких сложнейших биохимических методик стала возможна проверка гипотезы о дифференциальной экспрессии генов на молекулярном уровне; при этом следует выделить три постулата, которые необходимо подвергнуть проверке.

1. Ядро каждой клетки содержит полный геном, сформированный в оплодотворенном яйце. На молекулярном уровне это означает, что ДНК всех дифференцированных клеток идентична.
2. Неиспользуемые гены в дифференцированных клетках не разрушаются и не мутируют, они сохраняют способность к функционированию.
3. В каждой клетке экспрессируется лишь малая часть генома, при этом синтезируемая фракция РНК специфична для клеток данного типа.

Идентичность геномов

Мы уже рассмотрели некоторые генетические и эмбриологические данные, свидетельствующие об идентичности геномов. Аналогичные данные были получены также в ряде биохимических работ с использованием гибридизации нуклеиновых кислот.

Первое крупномасштабное молекулярное исследование идентичности ДНК в организме было выполнено в 1964 г. (McCarthy, Noyer, 1964). Оказалось, что одноцепочечные ДНК, выделенные из мышечных клеток всех типов, с одинаковой эффективностью подавляют гибридизацию одноцепочечной ДНК с генами зародышей мыши. Это с достаточной убедительностью говорит о том, что ДНК в клетках всех типов одинакова по числу и типу последовательностей.

Данные о присутствии в дифференцированных клетках определенных генов, которые не синтезируют специфический для них продукт, были получены с помощью метода, названного **гибридизацией in situ** (Mary Lou Pardue, Gall, 1970). Гибридизация in situ проводится с полированными хромосомами, денатурированными таким образом, что цепи множественных спиралей ДНК уже разделены, однако хромосомы все еще видны на препаратах. Радиоактивную РНК или кДНК добавляют к денатурированной ДНК и затем после соответствующего периода инкубации препарат отмывают. В ходе инкубации РНК способна связаться с кодирующими ее участками ДНК. После промывки препараты покрывают прозрачной фотографической эмульсией. Радиоактивность связанной РНК сен-

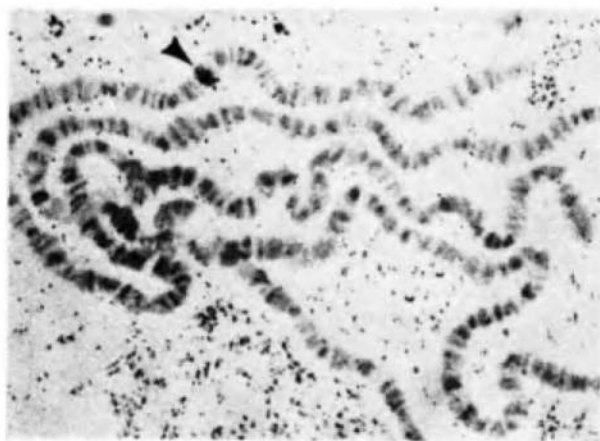


Рис. 10.15. Гибридизация in situ кДНК желточного белка с полированными хромосомами из слюнных желез личинки *Drosophila*. Темные зерна (указаны стрелкой) показывают, где радиоактивная кДНК желточного белка (приготовлена из мРНК желточного белка) связалась с хромосомами. (Из Barnett et al., 1980. Фотография с любезного разрешения P. C. Wensink.)

сибилизирует зерна серебра в эмульсии, которые при проявлении эмульсии образуют черные точки над соответствующим диском хромосомы. Следовательно, с помощью РНК для определенного продукта можно выявить диск, в котором она синтезируется. На рис. 10.15 приведен радиоавтограф, который показывает локализацию ^{32}P в для одного из желточных белков у дрозофилы. ДНК дрозофилы была клонирована и скринирована с помощью частично очищенной мРНК к этому белку; было обнаружено несколько клонов, ДНК которых обладала способностью направлять синтез желточного белка. Эти клоны были выращены и гены желточного белка выделены. Один из этих клонов был использован для получения радиоактивного зонда, который гибридизовали с препаратами полированных хромосом из клеток слюнных желез. Как видно из рисунка, полученная кДНК связывается с одним определенным диском. Однако слюнные железы не синтезируют данный белок. Единственными клетками, синтезирующими желточные белки в норме, являются ооциты и клетки жирового тела взрослой самки. Таким образом, было показано, что ген, активный исключительно в клетках жирового тела взрослой особи и в ооцитах, присутствует в хромосомах слюнных желез личинки.

Стабильность генов

Оказалось возможным показать также, что гены, неиспользуемые в дифференцированных клетках, при определенных условиях могут быть активиро-

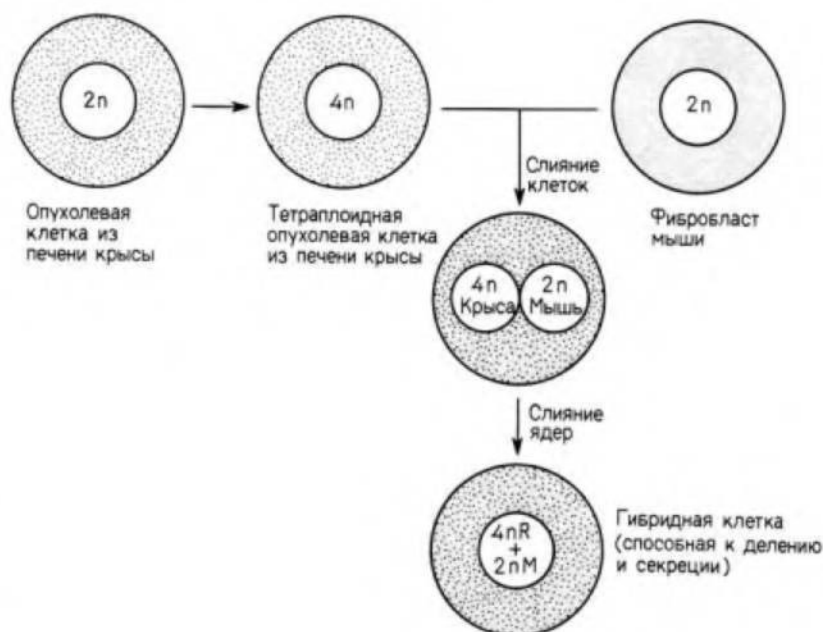


Рис. 10.16. Активация молчащих генов при слиянии соматических клеток. Слияние тетраплоидной опухолевой клетки из печени крысы и диплоидного фибробласта мыши приводит к образованию гибридной клетки, которая экспрессирует гены мыши, специфичные для печени.

ваны и что они могут продуцировать белки, специфичные для клеток других типов. Убедительные данные о реактивации неиспользуемых генов у млекопитающих были получены в лаборатории Мэри Бейс (Peterson, Weiss, 1972; Brown, Weiss, 1975) при использовании методики слияния дифференцированных клеток различных типов. Клетки могут сливаться естественным образом (как в случае развития мышц), или их можно искусственно стимулировать к слиянию, воздействуя такими агентами, как инактивированный вирус Сендай (вирус мышиной кори) или полиэтиленгликоль¹. При слиянии клеток возникает ситуация, при которой два ядра оказываются в общей цитоплазме (рис. 10.16). В благоприятных условиях оба ядра гибридной клетки одновременно войдут в митоз и в результате образуют гибридное ядро, содержащее хромосомы из родительских клеток обоих типов. В большинстве случаев, когда клетки двух различных типов сливаются друг с другом, полученный гибрид теряет свойства, характерные для родительских клеток. В результате слияния опухолевых клеток из печени крысы с фибробластами мыши Бейс смогла получить гибриды, содержащие два набора хромосом из печени на один набор из фибробластов. Эти клетки сохранили способность синтезировать белки, специфичные для печени крысы, такие, как альбумин, альдолаза и тирозинаминотрансфераза (ТАТ). Более удивительно,

что кроме этих белков они синтезировали также мышинные альбумин, альдолазу и ТАТ – три белка, которые никогда не синтезируются фибробластами. Фибробласты мыши сохранили гены, специфичные для печени, в форме, которая допускает их экспрессию в определенных условиях. Эта ситуация соответствует общему правилу развития животных: в процессе дифференцировки клеток необратимых генетических изменений не происходит.

Нарушение стабильности геномов: изменения в генах лимфоцитов

Использование методов молекулярной биологии позволило выявить интересное исключение из сформулированного выше правила; исключение это – дифференцировка лимфоцитов. В соответствии с общим правилом неиспользуемые гены присутствуют в дифференцированных клетках и сохраняют способность к функционированию. Набор генов одинаков во всех тканях. Геном же каждого типа лимфоцитов отличается от генома любых других типов клеток в организме, в том числе и от геномов других типов лимфоцитов. Примером такого рода являются В-лимфоциты – клетки, которые синтезируют антитела.

Антитела образуются, когда чужеродный субстрат (антиген) приходит в контакт с В-лимфоцитами, находящимися в лимфатических узлах и селезенке. Еще до контакта с антигеном в каждом из

¹ В последнее время широко используется слияние клеток или их фрагментов в электрическом поле. – Прим. ред.

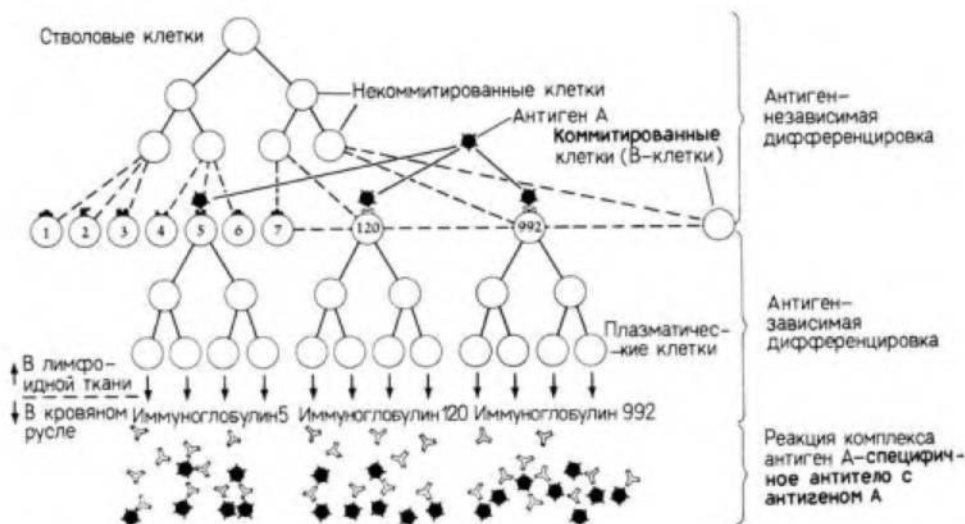


Рис. 10.17. Модель клональной селекции для формирования антител. Поверхность В-лимфоцитов приобретает свою специфичность до контакта с антигеном. В клеточной мембране имеются антитела лишь одного типа. В-лимфоциты, у которых связанные с мембраной антитела присоединили антиген, пролиферируют, продуцируя клоны плазматических клеток, которые секретируют антитела с той же самой специфичностью, что и поверхностные антитела, связавшие антиген. (По Edelman, 1970.)

покоящихся В-лимфоцитов синтезируются молекулы антител, однако из клеток они не выделяются, а встраиваются в клеточные мембраны лимфоцитов. Каждый В-лимфоцит продуцирует антитела, которые узнают один и только один антиген. Таким образом, антитела, узнающие белковую оболочку вирусов полиомиелита, не будут узнавать холерный токсин, мембрану клетки *E. coli* или вирус гриппа.

После того как связанные с мембраной антитела присоединяют молекулы определенного антигена, В-лимфоцит многократно делится и дифференцируется в **плазматическую клетку**, *секретирующую* антитела (рис. 10.17 и 10.18). (Механизм этой дифференцировки будет подробно рассмотрен в гл. 16.) К размножению и секреции антител стимулируются только те В-лимфоциты, которые обладают способ-

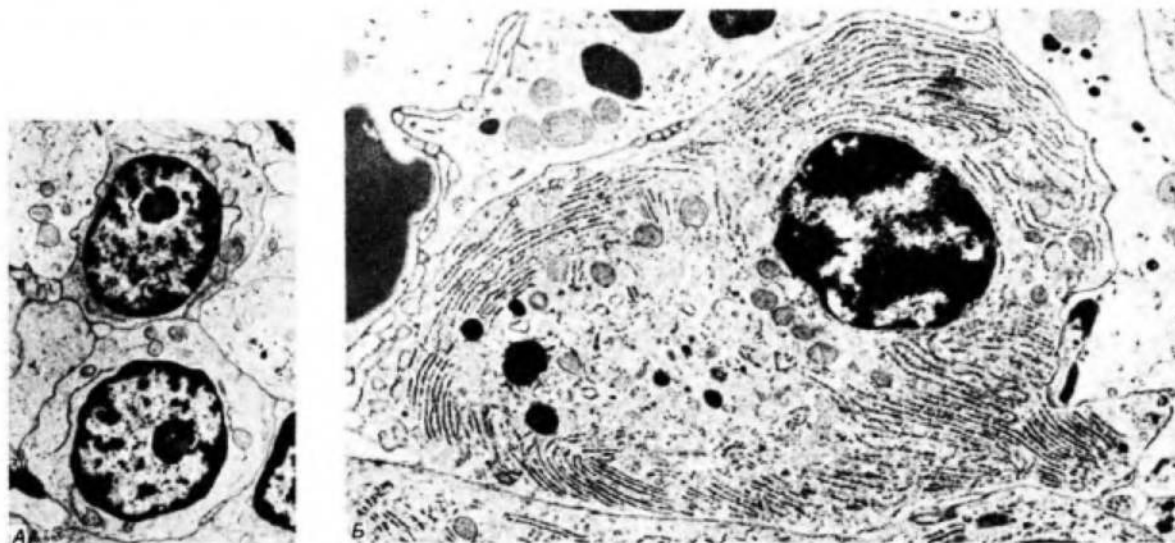
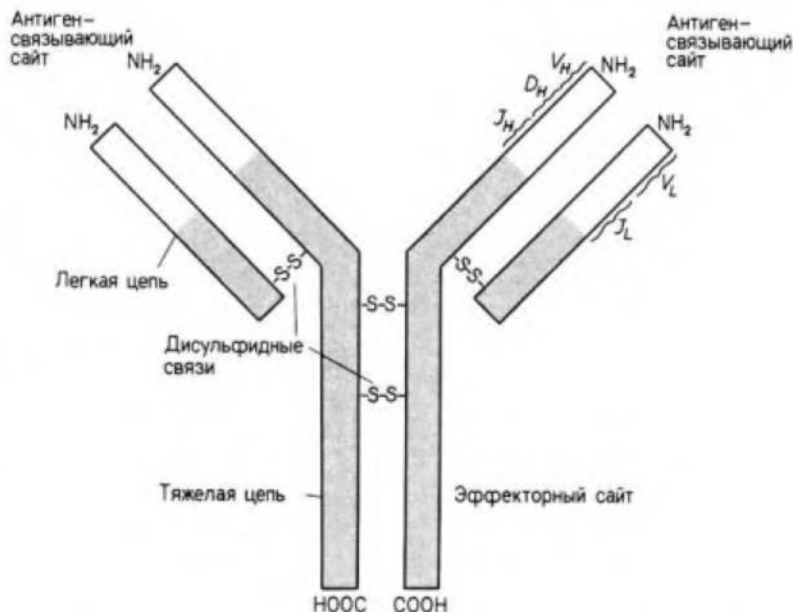


Рис. 10.18. А. В-лимфоцит. Б. Плазматическая клетка. Обратите внимание на расширение сети шероховатого эндоплазматического ретикулума, когда В-лимфоцит становится плазматической клеткой, секретирующей антитела. (Фотографии с любезного разрешения L. Weiss.)

Рис. 10.19. Структура типичного иммуноглобулина (антитела). Две идентичные тяжелые цепи соединены дисульфидными связями. Антиген-связывающий сайт формируется из переменных областей (белые) тяжелой и легкой цепей, тогда как эффекторный сайт антитела (контролирующий способность антител агглютинировать с антигенами, присоединяться к макрофагам или входить в состав слизистых секретов) определяется аминокислотной последовательностью константной области (серая) тяжелых цепей.



ностью связывать данный антиген. В соответствии с этой моделью, названной **теорией клональной селекции** (Burnett, 1959), каждый В-лимфоцит приобретает присущую ему специфичность *до контакта* с антигеном. Иными словами, из миллионов различных видов антител, которые каждый В-лимфоцит может производить, он «выбирает» только один вид и размещает антитела этой специфичности на своей клеточной поверхности.

Механизм этой селекции по специфичности антител включает образование новых генов в ходе дифференцировки В-лимфоцитов. Белок антитела на клеточной поверхности состоит из двух пар полипептидных субъединиц (рис. 10.19): двух идентичных тяжелых цепей и двух идентичных легких цепей. Цепи связаны друг с другом дисульфидными связями. Специфичность молекулы иммуноглобулина (т.е. избирательность связывания с вирусом поли-

омиелита, клеткой *E. coli* или какими-либо другими молекулами) определяется последовательностью аминокислот в **переменной области**. Эта область формируется из amino-концов одной тяжелой цепи и одной легкой цепи. Переменные области молекул иммуноглобулинов присоединены к **константным областям**, которые придают антителу его эффекторные свойства. Например, константная область тяжелых цепей молекул поверхностных иммуноглобулинов удерживает эти белки в клеточной мембране.

ФОРМИРОВАНИЕ ГЕНОВ ЛЕГКИХ ЦЕПЕЙ АНТИТЕЛ. Гены для легких и тяжелых цепей лимфоцитов разделены на сегменты. Гены легких цепей состоят из трех сегментов (рис. 10.20). Первый сегмент гена кодирует переменную (V) область легкой цепи. Она содержит около 300 различных последовательностей, которые кодируют в общей сложности пер-

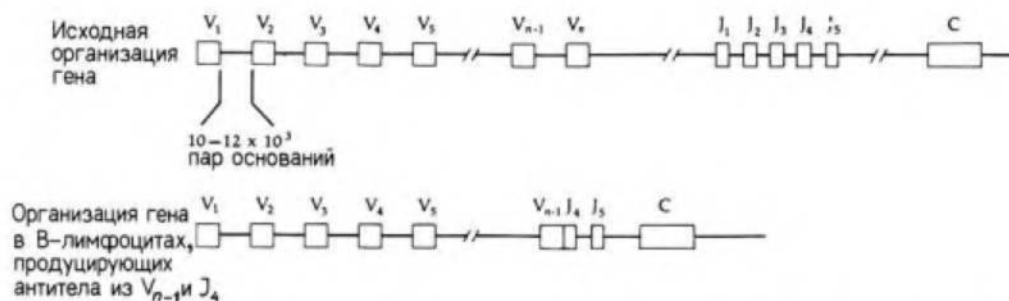
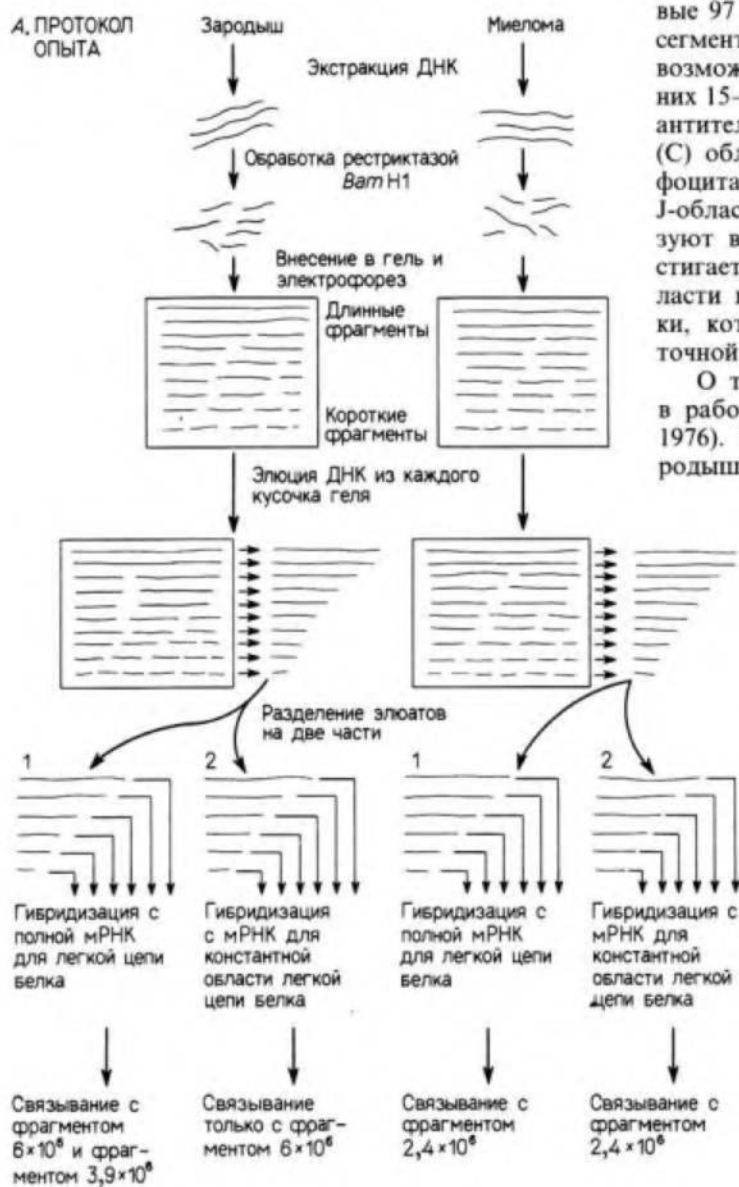


Рис. 10.20. Перестройка генов легких цепей в ходе развития В-лимфоцитов. До стимуляции антигеном один из 300 или большего числа V-сегментов гена объединяется с одним из пяти J-сегментов гена и сближается с константным (C) сегментом гена.



Рис. 10.21. Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК. ДНК, разрезанная рестриктазой *Bam* HI, помещается в карман геля. В электрическом поле мелкие фрагменты движутся быстрее, чем крупные. После разделения фрагментов (на основе их размеров) гель разрезают и фрагменты ДНК элюируют для последующей гибридизации.

А. ПРОТОКОЛ ОПЫТА



вые 97 аминокислот легкой цепи антитела. Второй сегмент, J-область, состоит из четырех или пяти возможных последовательностей ДНК для последних 15–17 остатков варибельной части легкой цепи антитела. Третий сегмент определяет константную (C) область легкой цепи. В ходе развития В-лимфоцита одна из трехсот V-областей и одна из пяти J-областей комбинируются друг с другом и образуют варибельную часть гена антитела. Это достигается перемещением последовательности V-области к последовательности J-области – перестройки, которая сопровождается удалением промежуточной ДНК.

О такой перестройке гена впервые сообщалось в работе Хозуми и Тонегавы (Hozumi, Tonegawa, 1976). Эти исследователи выделили ДНК из зародышей мыши и опухолевых В-клеток, секретир-

Рис. 10.22. Протокол и результаты опыта Хозуми и Тонегавы. ДНК из эмбриональных клеток мыши и В-клеток по отдельности гидролизуют рестриктазой *Bam* HI, фракционируют с помощью электрофореза и элюируют из гелей. Каждый элюированный препарат ДНК после денатурации гибридизуют или с полной мРНК, кодирующей варибельную и константную области легкой цепи иммуноглобулина, или с фрагментом мРНК, кодирующим только константную область легкой цепи белка (3'-конца). В случае эмбриональной ДНК варибельная и константная области легкой цепи белка были обнаружены в двух различных фрагментах ДНК (константная область располагалась на фрагменте с молекулярной массой $3,9 \times 10^6$, а варибельная область – на фрагменте ДНК с массой 6×10^6). В опухолевых лимфоцитах константная и варибельная области располагались вместе на одном фрагменте ДНК, имеющем молекулярную массу $2,4 \times 10^6$. (По Hozumi, Tonegawa, 1976.)

рующих легкие цепи¹. Каждый из двух препаратов ДНК обрабатывали рестриктазой *Bam*HI, которая расщепляет в ДНК последовательность ГГАТЦЦ, где бы она ни находилась. В результате были получены серии фрагментов ДНК. Размеры каждого фрагмента определялись длиной участка ДНК между двумя сайтами расщепления.

Полученные фрагменты ДНК наносили на край желеобразного плоского геля, через который пропускали электрический ток (рис. 10.21). При миграции ДНК к положительному электроду меньшие по размеру фрагменты двигались быстрее, чем ее крупные фрагменты, за счет чего достигалось эффективное разделение фрагментов по размерам. Гель с распределенной по нему ДНК разрезали на кусочки, каждый из которых содержал фрагменты ДНК определенного размера². Из каждого кусочка элюировали ДНК и денатурировали ее. Часть этой ДНК гибридизовали с радиоактивной РНК, которая кодирует полную легкую цепь и была изолирована из исходных опухолевых В-клеток. Другую часть гибридизовали с радиоактивной РНК, которая кодирует лишь С-область легкой цепи (фрагмент мРНК

с 3'-конца). ДНК из клеток зародышей связывалась с мРНК легкой цепи в двух зонах геля. ДНК в первой зоне имела молекулярную массу около 6 млн. дальтон, тогда как ДНК во второй зоне — 3,9 млн. дальтон. При гибридизации ДНК зародышей мыши с мРНК для С-области легкой цепи эта РНК связывалась лишь с ДНК из зоны с молекулярной массой 6 млн. Таким образом, в зародышах мыши С-область кодируется внутри фрагмента ДНК с молекулярной массой 6 млн. (между сайтами *Bam*HI), тогда как V-область кодируется внутри фрагмента с массой 3,9 млн. (рис. 10.22).

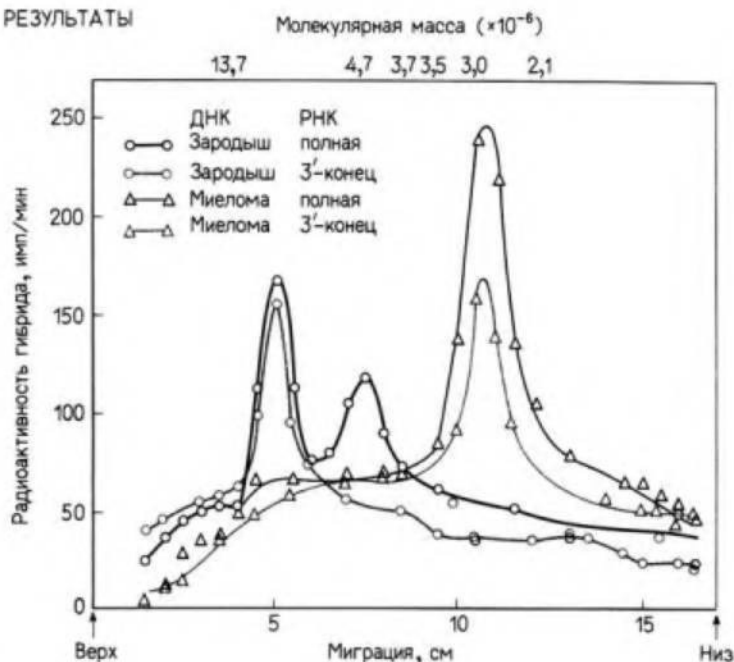
Принципиально иной результат был получен для ДНК из опухолевых лимфоцитов. Единственная зона ДНК, связывающая мРНК легкой цепи, имела молекулярную массу 2,4 млн. Кроме того, эта зона связывала фрагмент мРНК, кодирующий С-область легкой цепи. Оказалось, что обе области, С и V, кодируются одним и тем же фрагментом ДНК! Простейшее объяснение, которое было многократно подтверждено в других лабораториях и с помощью иных методов (см. Brack et al., 1978; Bernard et al., 1978; Seidman et al., 1979), заключается в том, что два фрагмента гена, один из которых кодирует С-область легкой цепи и другой — специфичную V-область легкой цепи, соединились вместе, *образовав новый ген*. Новый ген возник в ходе развития лимфоцита. Предложенная авторами схема образования такого гена показана на рис. 10.23.

ФОРМИРОВАНИЕ ГЕНОВ ТЯЖЕЛЫХ ЦЕПЕЙ АНТИТЕЛ. Гены тяжелых цепей антител содержат даже боль-

¹ Опухолевые клетки были использованы потому, что они синтезируют огромное количество определенного иммуноглобулина (и мРНК для этого иммуноглобулина).

² Размер ДНК в каждом кусочке геля определяли по миграции фрагментов ДНК с известной длиной на параллельной дорожке.

Б. РЕЗУЛЬТАТЫ



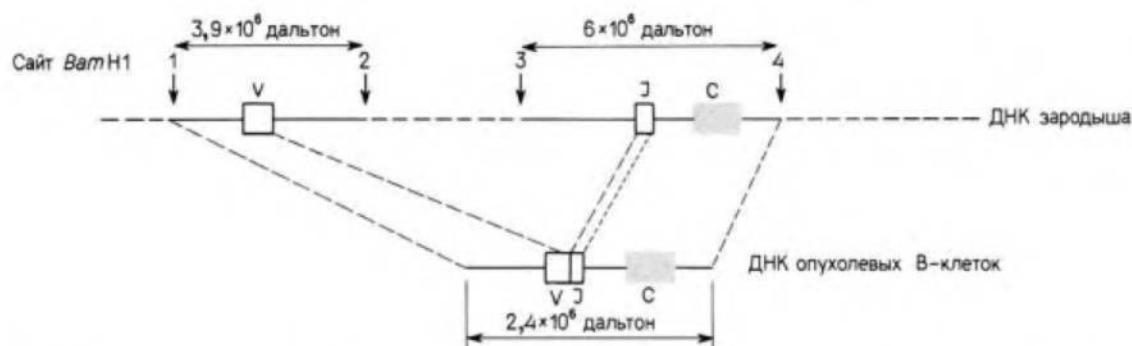


Рис. 10.23. Модель перестроек в ДНК при переходе от эмбриональных клеток к В-лимфоцитам по данным Хозуми и Тонегавы. (Hozumi, Tonegawa, 1976.)

шее число сегментов, чем гены легких цепей. Сегменты гена тяжелой цепи включают V-область (200 различных последовательностей для первых 97 аминокислот), D-область (10–15 различных последовательностей для 3–14 аминокислот) и J-область (четыре последовательности для последних 15–17 ами-

нокислот V-области). Следующий фрагмент – это С-область. Варибельная область тяжелой цепи формируется в результате присоединения одной V-последовательности и одной D-последовательности к одной из J-последовательностей (рис. 10.24, А, Б). Эта VDJ-последовательность варибельной час-

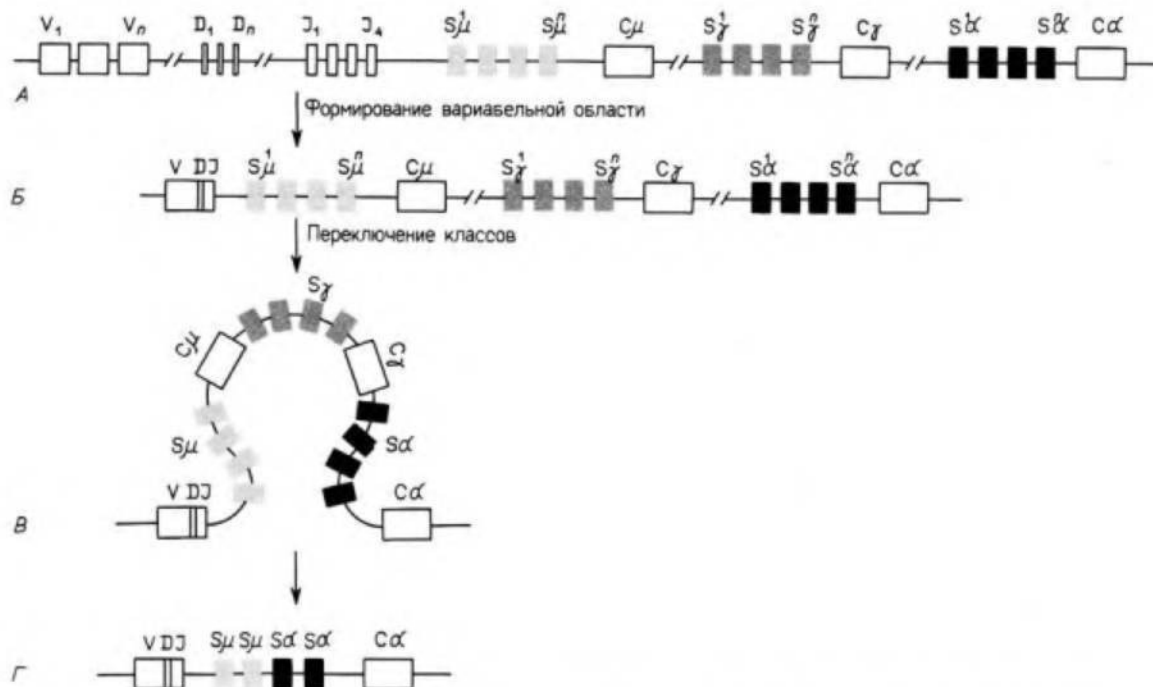


Рис. 10.24. Формирование варибельной области гена и переключение классов при синтезе тяжелых цепей иммуноглобулинов. Ген тяжелой цепи содержит три области, которые объединяются вместе для формирования варибельной области (V, D и J), и константную область (C). Четыре главных класса антител различаются по константной области (IgA содержит Cα; IgM – Cμ; IgG – Cγ; IgE – Cε). До встречи с антигеном варибельная область формируется объединением V-, D- и J-сегментов. Этот VDJ-сегмент гена сближается с константной μ-областью, и полученное антитело встраивается в клеточную мембрану. После встречи с антигеном участок ДНК может образовать петлю таким образом, что VDJ-сегмент сближается с другой константной областью (в данном случае с константной α-областью, которая позволяет антителам войти в состав слизистых секретов). В этом переключении классов участвуют группы последовательностей-переключателей (S), прилежащих к каждой из константных областей. (По Davis et al., 1980a, b.)

ти далее присоединяется к первой С-области тяжелой цепи, специфичной для антител, которые могут быть встроены в плазматическую мембрану. Таким образом, молекулы антител формируются двумя генами, возникающими в ходе антигеннезависимой стадии развития В-лимфоцита. Эти молекулы встраиваются в клеточную мембрану и служат рецепторами антигенов.

ПЕРЕКЛЮЧЕНИЕ КЛАССОВ В ГЕНАХ ТЯЖЕЛЫХ ЦЕПЕЙ. После стимуляции антигеном В-клетка делится и дифференцируется в **плазматическую клетку**, секретирующую антитела. Вначале антитела, синтезируемые этими клетками, содержат ту же С-область, что и ранее. Однако при дальнейшем синтезе антител С-область может измениться. Исходную С-область называют константной μ -областью (С μ). Следующая С-область – та, что содержится в секретируемых антителах, – может остаться μ -областью (хотя и с модификацией, которая обеспечивает секрецию), но может также стать гамма(γ), эpsilon(ϵ)- или альфа(α)-константной областью. Таким образом, один и тот же переменный участок тяжелой цепи может соединяться вначале с константной μ -областью, а позже, например, с константной γ -областью. Это явление называется **переключением классов**. (Класс тяжелых цепей антител определяет характер их функционирования: μ - и γ -цепи стимулируют лизис, агглютинацию или разрушение антигена макрофагами; ϵ -цепи вызывают воспалительный процесс, а α -цепи обеспечивают выделение антител в слезы, слюну и молоко.) Переключение классов осуществляется транслокацией полного сегмента переменной области гена (VDJ) из положения перед константной μ -областью в участок, примыкающий к константной γ -, ϵ - или α -об-

ласти (рис. 10.24, В, Г). Этот процесс заключается в делении сегмента константной μ -области гена из генома (Davis et al., 1980; Cory et al., 1980; Rabbits et al., 1980; Yaoita, Honjo, 1980).

Таким образом, геном плазматической клетки существенно отличается от генома любой другой клетки. Во-первых, в нем была создана последовательность переменной области гена посредством объединения различных сегментов ДНК. В клетках всех других органов эти сегменты ДНК разделены, а в В-лимфоцитах и плазматических клетках они собраны вместе. Во-вторых, во многих плазматических клетках часть генома (а именно ДНК из константной μ -области тяжелых цепей) элиминируется из ядер. Определенная часть генома утрачивается в ходе развития плазматической клетки; создаются новые гены, тогда как другие – разрушаются.

Какие выводы можно сделать? Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что ядра дифференцированных клеток действительно сохраняют основную часть своей генетической информации в форме, которая допускает ее экспрессию в соответствующих условиях. Тем не менее очевидно, что по крайней мере при дифференцировке клеток одного типа происходит некоторая утрата генетического материала. Пока у нас нет возможности выяснить, каково разнообразие необратимых генетических изменений, которые могут происходить в процессе развития животных. Однако известные нам сведения о перестройке генов в лимфоцитах указывают на то, что необратимые генетические потери являются следствием клеточной дифференцировки, а не ее причиной.

Дополнительные сведения и гипотезы Изменения генов

Геном плазматических клеток дефицитен по определенным последовательностям ДНК, которые необходимы для дифференцировки. Клетки иммунной системы другого типа – Т-лимфоциты – также утрачивают часть генома при формировании рецепторов своего антигена (Fujimoto, Yamagishi, 1987). Но это лишь одна из форм генетической нестабильности. Известны и другие примеры (Borst, Greaves, 1987). Геном паразитического простейшего *Trypanosoma brucei*, вызывающего сонную болезнь, может меняться, чтобы продуцировать разные гликопротеины клеточной поверхности (благодаря этому паразит ускользает от иммунной системы хозяина). Сходный механизм, по всей вероятности,

ответствен за изменение типа скрещивания у дрожжей (Hoeijmakers et al., 1980; Haber et al., 1980; Strathern et al., 1979). В этом случае каждая гаплоидная клетка содержит оба гена, определяющие тип скрещивания. Выбор типа скрещивания зависит от того, какой из этих генов занимает определенную позицию на хромосоме. Эти позиции переключаются в процессе деления клеток. Так, если в одном поколении ген типа скрещивания *a* находится в локусе «включено», то в следующем поколении в этом положении находится ген *a*, а ген *a* дожидается своей очереди по соседству.

В каждом из этих трех примеров фигурируют гены, ответственные за узнавание клеточной по-

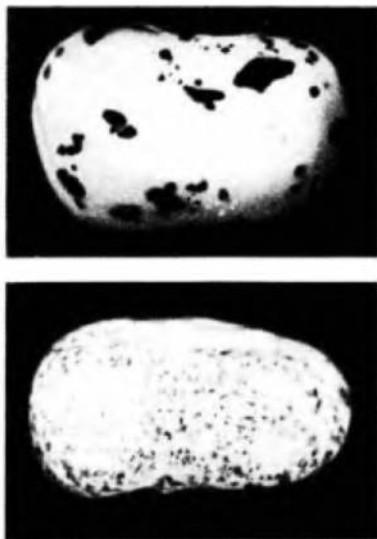


Рис. 10.25. Зерна кукурузы с пигментированными участками, сформированными клетками, в которых транспозон покинул область генов, образующих пигмент. Клетки в неокрашенных зонах не способны синтезировать пигмент, так как присутствующий транспозон продолжает инактивировать ген, ответственный за синтез пигмента. (По Peterson, 1977; фотографии с любезного разрешения R. A. Peterson.)

верхностью. Это явление наблюдается в ходе всего развития позвоночных (часть III), поэтому не следует удивляться тому обстоятельству, что утрата тотипотентности была вызвана необратимыми изменениями генома.

В дополнение к уже описанным рекомбинантным событиям разнообразие антител может создаваться также в результате соматических мутаций. Было показано, что при дифференцировке В-клетки в плазматическую клетку происходит значительное количество точковых мутаций (Crews et al., 1981).

Мутации другого типа являются следствием встраивания в ген **мобильных элементов** (или **транспозонов**). Транспозоны представляют собой подвижные фрагменты ДНК, которые могут интегрироваться в различные части генома. Если мобильный

элемент разрывает структурный ген, то ген инактивируется. Такая ситуация наиболее хорошо изучена на примере бактерий, кукурузы и дрозофилы. У кукурузы транспозон, встроившийся в ген окраски зерен или рядом с этим геном, вызывает образование бесцветных зерен (McClintock, 1952; Peterson, 1980). Однако после удаления транспозона из гена синтез пигмента восстанавливается. В результате наблюдается мозаичный фенотип (рис. 10.25). У дрозофилы мутация *white-apricot* вызывается встраиванием мобильного элемента в область гена *white* (см. цветную таблицу на внутренней стороне обложки; Green, 1980; Gehring, Paro, 1980). До сих пор неизвестны случаи, когда подобные изменения в положении транспозонов управляют какими-либо процессами развития. Транспозоны могут встраиваться в геномную ДНК подобно тому, как встраиваются ретровирусы, и они могут быть использованы, подобно ретровирусам, для введения нового генетического материала в клетки дрозофилы (Spradling, Rubin, 1982).

Итак, ясно, что геном представляет собой динамическое целое и не является абсолютно стабильной структурой. Способность ядер к изменению явилась сюрпризом для многих биологов, однако она была предсказана основоположником генной теории Томасом Хантом Морганом. В 1927 г. Морган письменно свидетельствует, что «наиболее общим генетическим допущением является то, что гены остаются неизменными в продолжение всего времени [развития]». Он разъясняет, что «основа строения гена остается всегда одной и той же, а постулируемые добавления или изменения гена являются событиями такого порядка, которые происходят в протоплазме. Если последняя может изменяться при дифференцировке в новой окружающей среде, не утрачивая своих фундаментальных свойств, то почему этого не могут делать гены? Совершенно очевидно, что этот вопрос выходит за пределы имеющихся данных, но в качестве возможности его не следует отбрасывать. С ответом на этот вопрос следует подождать до того времени, пока не удастся получить экспериментальные данные».

Дифференциальный синтез РНК

Третий постулат – то, что лишь небольшая часть генома участвует в создании тканеспецифических продуктов, – был проверен также для многих организмов. Цитоплазматическая РНК насекомых и позвоночных гибридизовалась менее чем с 10% возможных доступных сайтов ДНК, хотя были получены данные, что эта РНК содержит все тканеспецифические последовательности. При изучении

дрозофилы (Becker, 1959) и личинок комара *Chironomus* (Beermann, 1952) было обнаружено, что в хромосомах существуют «раздутые» участки. Такие участки, или пuffy, обнаруживались в различных областях хромосом из разных тканей, и их расположение менялось в ходе развития клеток (рис. 10.26). Кроме того, образование некоторых пufов можно было индуцировать или подавить изменени-

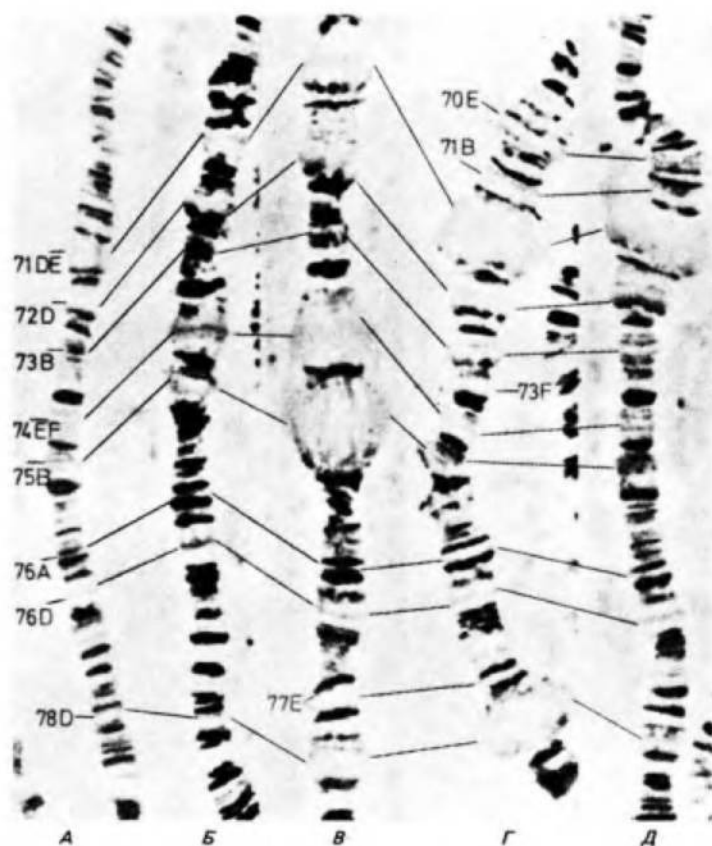


Рис. 10.26. Последовательность пufов на участке хромосомы III в слюнной железе личинки *Drosophila melanogaster*. А, Б. Личинка в возрасте 110 ч. В. Личинка в возрасте 115 ч. Г, Д. Стадии предкуколки, разделенные 4 ч. Обратите внимание на пufинг и регрессию дисков 74EF и 75B. Другие диски (71DE, 78D) образуют пufы позже, однако большинство дисков совсем не образуют пufы в этот период. (Фотография с любезного разрешения М. Ashburner.)

ем физиологических условий, например при тепловой или гормональной обработке (Clever, 1966; Ashburner, 1972; Ashburner, Berendes, 1978).

В настоящее время известно, что эти пufы представляют собой расплетание политенной хромосомы в менее компактную структуру (рис. 10.27). Впервые данные о том, что такие пufы являются местом активного синтеза мРНК, были получены Бирманом (Beermann, 1961). Этот автор обнаружил два скрещивающихся между собой вида *Chironomus*, один из которых продуцировал мажорный белок слюны, а другой не продуцировал (рис. 10.28). У продуцента в определенной зоне политенных хромосом из клеток слюнной железы личинки имелся большой пuf (кольцо Бальбиани); этот пuf отсутствовал у непродуцентов. У гибридной личинки, полученной в результате скрещивания продуцента с непродуцентом, синтезировалось промежуточное количество белка слюны. После скрещивания двух гибридных особей способность продуцировать белок слюны сегрегировала в соответствии с правилом Менделя (1 хороший продуцент:2 промежуточных продуцента:1 непродуцент). Кроме того, оказалось, что хороший продуцент имеет два пufa (по

одному на каждой гомологичной хромосоме), тогда как промежуточный продуцент имеет лишь один пuf. Исследователь пришел к выводу, что генетическая информация, необходимая для синтеза данного белка слюны, представлена в этом дистальном диске хромосомы и что синтез данного продукта зависит от превращения этого диска в пuf.

Дополнительные данные о том, что хромосомные пufы синтезируют мРНК, были получены при исследовании пufов кольца Бальбиани 2 из клеток *Chironomus tentans*. Исключительно большие размеры кольца Бальбиани 2 (BR2) позволяют изолировать его с помощью методов микрохирургии. Для анализа продуктов его активности используют электрофорез и радиоавтографию (Lambert, Daneholt, 1975). На рис. 10.29 показано выделение BR2 из хромосомы IV *Ch. tentans*. Чтобы проследить судьбу РНК кольца Бальбиани, из клеток слюнных желез можно выделить также нуклеоплазму и цитоплазму. Транскрипцию в кольце Бальбиани 2 выявляют, инкубируя изолированные слюнные железы с радиоактивными предшественниками РНК и затем экстрагируя радиоактивную РНК из участка BR2 рассеянной хромосомы (Lambert, 1972). Коэффици-

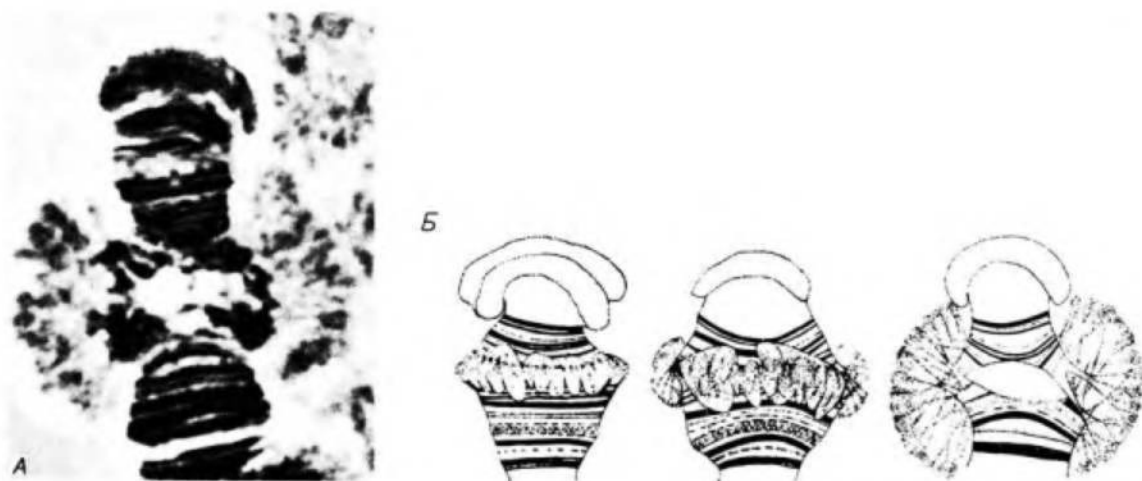


Рис. 10.27. Проксимальный конец хромосомы IV из слюнной железы *Chironomus pallidivittatus*, содержащий гигантский пух BR2. А. Микрофотография в фазовом контрасте окрашенного препарата, на которой виден гигантский пух на политенной хромосоме. Б. Схематическое изображение участка BR2, претерпевающего пухинг. (А – по Grossbach, 1973; фотография с любезного разрешения U. Grossbach. Б – по Beermann, 1963.)

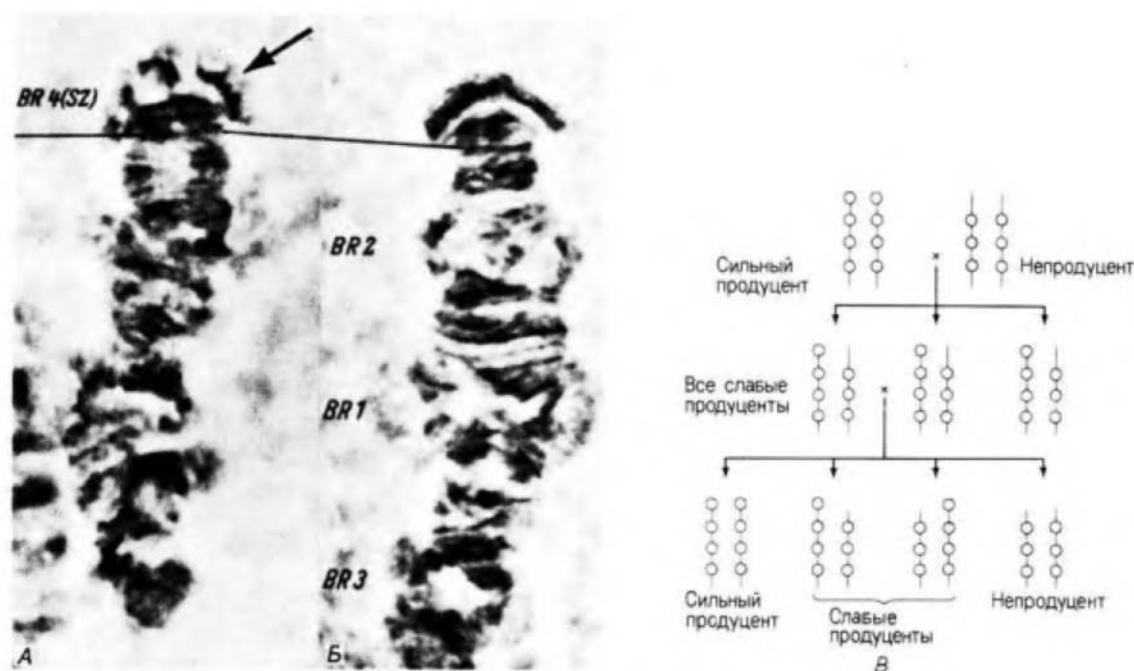


Рис. 10.28. Корреляция пухинга со специализированными функциями клеток слюнной железы *Chironomus pallidivittatus*. А. Хромосома IV из клетки слюнной железы, продуцирующей зернистый секрет, имеет дополнительное кольцо Бальбиани [BR 4(SZ)]. Б. В хромосоме IV из прозрачной слюнной клетки обнаруживаются только кольца Бальбиани 1, 2 и 3 (BR1, BR2, BR3). В. Генетические данные, свидетельствующие о том, что синтез основного белка слюны зависит от формирования пуха BR4(SZ). У личинок, синтезирующих большие количества зернистого секрета, обе хромосомы IV в клетке слюнных желез имеют пухи BR4(SZ), тогда как у личинок, не синтезирующих этот секрет, в хромосомах не имеется таких пухов. Промежуточные продуценты имеют лишь одну хромосому IV с пухом BR4(SZ) в каждой слюнной клетке, синтезирующей этот секрет. (Б – по Beermann, 1961; фотографии с любезного разрешения W. Beermann.)

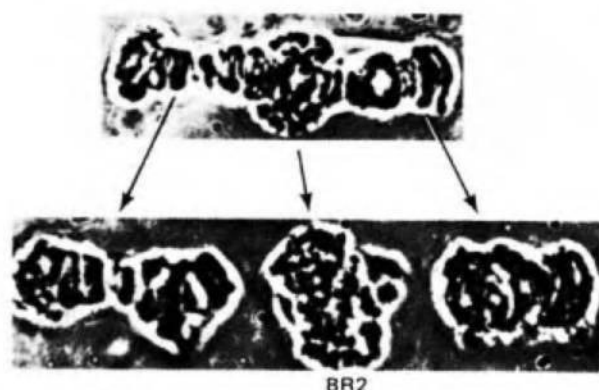


Рис. 10.29. Выделение участка BR2 *Chironomus tentans* с помощью микроманипуляций. Интактная хромосома IV может быть разделена на три фрагмента, один из которых содержит BR2. (Из Lambert, Daneholt, 1975; фотография с любезного разрешения В. Lambert.)



Рис. 10.30. Транскрипция на участке BR2 хромосомы IV из клеток слюнной железы *Chironomus tentans*. А. Препарат хромосомы, окрашенный толуидиновым синим. Стрелками указаны точки, в которых хромосома была разрезана для последующего синтеза РНК in vitro. Б. Радиоавтограф после гибридизации in situ BR2-РНК с препаратом хромосом. (Из Lambert, 1972; фотографии с любезного разрешения В. Lambert.)

циент седиментации этой РНК составляет 75 S, что указывает на исключительно большие размеры РНК (примерно 50 000 оснований). Эта 75S-РНК гибридизовалась исключительно с областью BR2 на хромосоме; следовательно, ее активная транскрипция проходила на ДНК пуфа, а не в каком-либо ином локусе (рис. 10.30). В отличие от большинства других РНК размеры 75S-РНК из кольца Бальбиани заметно не уменьшались при ее перемещении через ядро в цитоплазму. Отмеченное свойство делает эту РНК особенно ценной, поскольку если она кодирует белок, то из-за большого количества связывающихся с ней рибосом должен образовываться комплекс с исключительно высокой молекулярной массой. Поэтому слюнные железы вновь инкубировали с радиоактивными предшественниками РНК и комплексы цитоплазматических полисом осаждали в градиенте сахарозы. Некоторые полисомы характеризовались очень высоким коэффициентом седиментации. Этот результат указывает на присутствие РНК, способной связать большое количество рибосом, что и наблюдалось в действительности (рис. 10.31). Из этих гигантских полисом экстрагировали РНК (удаляя рибосомы с помощью ЭДТА) и в итоге получали 75S-РНК, которая гибридизовалась исключительно с областью BR2 хромосомы (Wieslander, Daneholt, 1977). Таким образом, РНК, транскрибируемая в области, где образуется пуф в слюнной железе личинки, затем участвует в синтезе белков на цитоплазматических рибосомах. Следовательно, пуфы на хромосомах слюнных желез активно синтезируют мРНК.

Боннер и Пардью (Bonner, Pardue, 1977) на молекулярном уровне получили данные, свидетельствующие о том, что по крайней мере некоторые пуфы отражают регулируемую в развитии транскрипцию

отдельных генов. Учитывая классическое наблюдение, что экдистерон вызывает появление одних пуфов и исчезновение других (рис. 10.32, А), эти исследователи инкубировали слюнные железы дрозофилы в среде с радиоактивными предшественниками РНК. Некоторые культуры содержали экдистерон, а другие — не содержали. Из этих культур выделяли РНК, которую затем связывали с хромо-



Рис. 10.31. Электронная микрофотография быстроседиментирующих полисом из участка BR2 хромосомы IV *C. tentans*. Полисомы синтезируют гигантский секреторный белок, специфичный для слюнных желез. (Из Daneholt et al., 1976; фотографии с любезного разрешения В. Daneholt.)

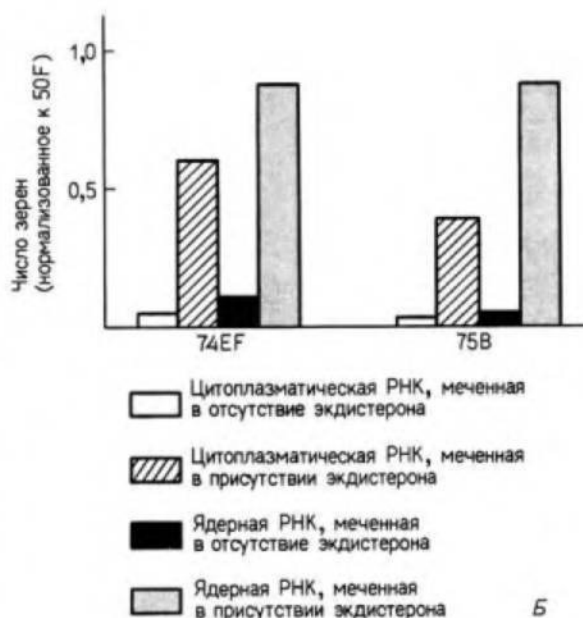


Рис. 10.32. Пуфы, индуцированные экдистероном, в культивируемых клетках слюнной железы *D. melanogaster*. Показан тот же участок хромосомы, что и на рис. 10.26. А. Цикл пуфинга, индуцированный экдистероном. I – неинкубированный контроль; II–V – хромосомы, стимулированные экдистероном соответственно через 25 мин, 1, 2 и 4 ч. Б. Гибридизация радиоактивной РНК *in situ* показывает, что хромосомы из культивируемых клеток слюнной железы после стимулирования экдистероном транскрибируют РНК в специфических участках (74EF и 75B). (А – с любезного разрешения М. Ashburner; Б – по Bonner Pardue, 1977.)

сомами слюнных желез с помощью гибридизации *in situ*. Гибридизация РНК с пуфами, индуцированными экдистероном, наблюдалась только в случае, если РНК была мечена в присутствии экдистерона (рис. 10.32, Б). Гибридизация с пуфами, подавляемыми экдистероном, проходила наилучшим образом, когда использовали РНК из тех желез, которые культивировали без экдистерона. Кроме того, РНК из имагинальных дисков, стимулированных экдистероном, не гибридизовалась со стимулированными экдистероном пуфами слюнных желез. Благодаря этому выяснилось, что эти пуфы являются тканеспецифичными, они меняются при изменении клеточной активности и в них синтезируются тканеспецифичные РНК.

Дифференциальная активность генов регулируется во времени и в пространстве. Для определения времени транскрипции определенных генов весьма ценными оказались клонированные гены. Сарджент и Дэвид (Sargent, Dawid, 1983) из зародышей *Xenopus* на стадии гаструлы выделили мРНК, которая отсутствовала в яйце. К этой мРНК были получены кДНК-копии. Эти кДНК из клеток гаструлы исследователи смешивали с избытком мРНК из ооци-

тов. Если мРНК ооцита гибридизуется с комплементарной ДНК гаструлы, то это означает, что данная кДНК получена для фракции мРНК, которая присутствует как в ооците, так и в зародыше на стадии гаструлы. Полученные двухцепочечные гибридные молекулы удаляли с помощью фильтрации, оставляя, таким образом, популяцию молекул кДНК, специфичных для гаструлы. Затем эти кДНК делали двухцепочечными (с помощью ДНК-полимеразы) и вводили в векторы для клонирования. Этот метод называют **клонированием с вычитанием**. Он позволяет получить стадиоспецифичную библиотеку клонов, мРНК для которых обнаруживается на одних стадиях и отсутствует на других (рис. 10.33).

Затем исследователи брали зародышей на разных стадиях развития от зиготы до головастика и для каждой стадии изолировали РНК. Эту РНК наносили в точки на нитроцеллюлозные фильтры так, чтобы на каждом фильтре была РНК со всех стадий. После того как РНК запекли на фильтре, одцепочечную ДНК, полученную из отдельных клонов, метили радиоактивностью и инкубировали с фильтрами. В случае если ген транскрибируется на данной стадии, радиоактивная кДНК для этого гена

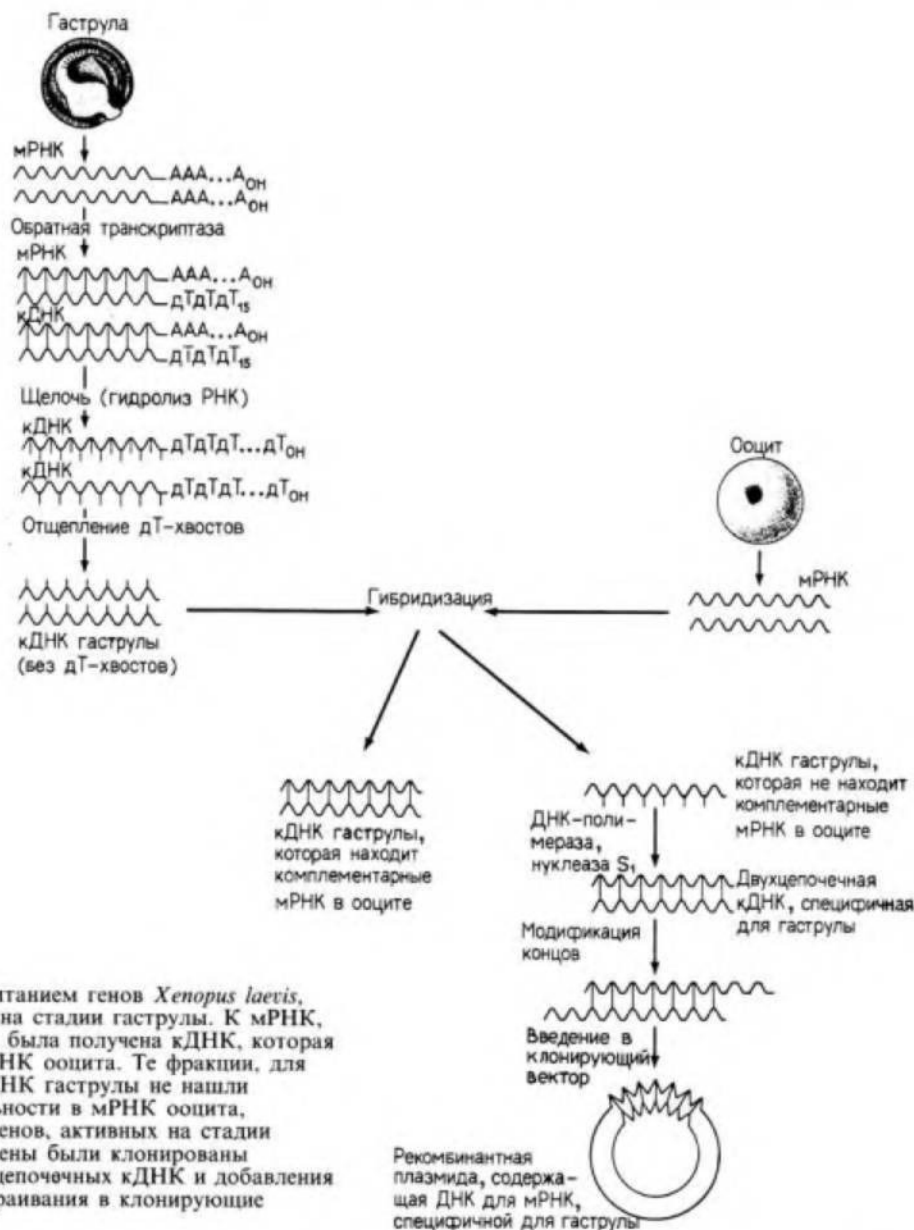


Рис. 10.33. Клонирование с вычитанием генов *Xenopus laevis*, экспрессирующихся специфично на стадии гастролы. К мРНК, выделенной на стадии гастролы, была получена кДНК, которая затем была гибридизована с мРНК ооцита. Те фракции, для которых последовательности кДНК гастролы не нашли комплементарные последовательности в мРНК ооцита, представляют собой продукты генов, активных на стадии гастролы, но не в ооците. Эти гены были клонированы с помощью приготовления двухцепочечных кДНК и добавления линкеров, необходимых для встраивания в клонирующие векторы.

должна найти на фильтре свой комплемент среди мРНК данной стадии. Затем несвязавшуюся кДНК отмывали, а связавшуюся радиоактивную кДНК регистрировали с помощью радиоавтографии. Этот метод называют **дот-блоттингом**. На рис. 10.34 показаны временные зависимости экспрессии для 17 генов, которые функционируют на разных этапах гастрюляции. Ни один из них не экспрессируется ранее средней бластулы на седьмом часу развития. Некоторые гены (DG64, DG39) экспрессируются сразу после этого, тогда как другие гены (например,

DG72 или DG81) начинают транскрибироваться на стадии средней гастролы примерно семью часами позже. После активации уровень активности некоторых генов (DG76, DG81) сохраняется, тогда как у других (DG56 или DG21) он существенно изменяется.

Если с помощью дот-блоттинга можно выявить *временную* специфичность экспрессии генов, то *пространственную* специфичность, т.е. тканеспецифический характер экспрессии генов, можно продемонстрировать с помощью модифицированного метода

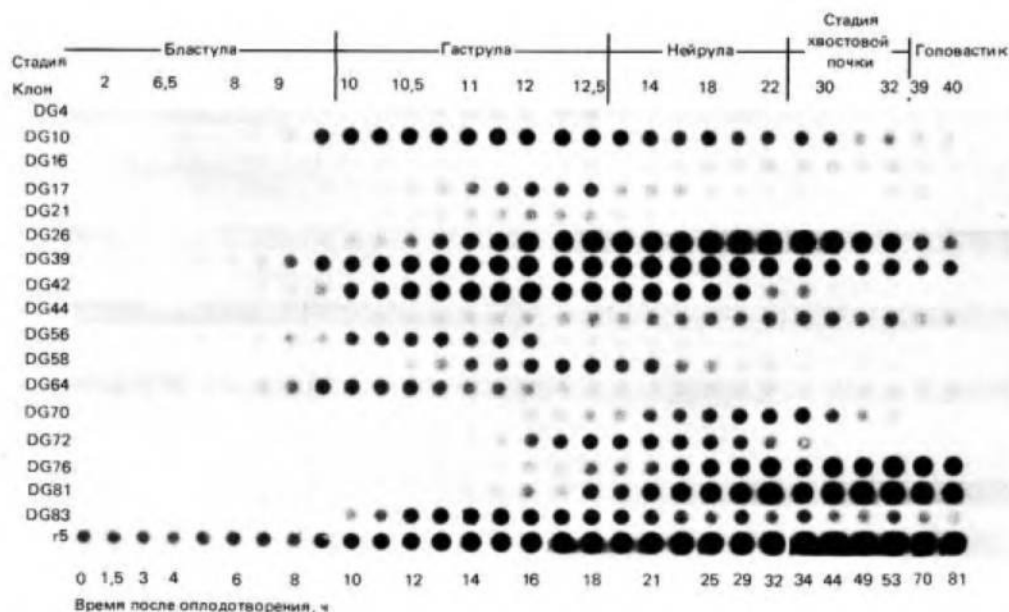


Рис. 10.34. «Дот-блот»-гибридизация, демонстрирующая периоды транскрипционной активности 17 генов в развитии *Xenopus*. Накопление специфических мРНК в цитоплазме определяли с помощью запекания всей мРНК с последовательных стадий эмбриогенеза и инкубации приготовленной бумажной полоски с радиоактивной ДНК, полученной из кДНК-клона, специфичного для гастрюлы. При совмещении этих полосок получается картина динамики активности специфичных генов в развитии. (Из Jamrich et al., 1985; фотография с любезного разрешения I. Dawid, M. Sargent.)



Рис. 10.35. Визуализация мРНК, специфичной для эктодермы, у морского ежа *S. purpuratus* с помощью гибридизации *in situ*. На верхних фотографиях представлены срезы личинок на стадии средней гастрюлы (А) и плутеуса (Б) при фазово-контрастной микроскопии. В нижнем ряду показаны те же срезы, гибридизованные с радиоактивной кДНК к мРНК, специфичной для эктодермы, при негативном контрасте. Гибридизация с РНК (выявляется как белые точки) происходит только в тех клетках, которые вошли или войдут в состав дорсальной эктодермы. (Из Lynn et al., 1983; фотографии с любезного разрешения R. Angerer, L. Angerer.)

гибридизации *in situ*. Этот метод был использован для демонстрации тканеспецифичности экспрессии определенных генов у зародышей морского ежа (Lynn et al., 1983). ДНК морских ежей разрушали с помощью рестриктазы, и ее фрагменты встраивали в плазмиды. Было обнаружено, что некоторые из этих клонов содержат ДНК, которая гибридизуется исключительно с мРНК, изолированной из эктодермы зародыша морского ежа. Затем эти специфичные для эктодермы плазмиды метили радиоактивностью с помощью ник-трансляции. Полученную радиоактивную ДНК денатурировали до отдельных цепей и гибридизовали со срезами зародышей морских ежей. На рис. 10.35 показано, что радиоактивная ДНК этих плазмид узнает РНК только в тех клетках гаструлы, которые дают начало дорсальной эктодерме плутеуса. Эта ДНК узнает также дорсальную эктодерму самой личинки. Известно, что соответствующие РНК синтезируют набор кислых белков, характерных для эктодермы. Таким образом, мы можем использовать гибридизацию *in situ* для визуализации пространственного распределения дифференциального синтеза РНК.

РЕЗЮМЕ

На основе данных, представленных в этой главе, мы можем сделать следующие выводы:

1. В дифференцированных клетках большинства типов неиспользуемые гены сохраняются в форме, которая допускает их экспрессию при соответствующих условиях.
2. В особых случаях, таких, как образование плазматических клеток, клеточная дифференцировка сопровождается утратой генетического материала. (Даже в этих примерах утрата специфических последовательностей ДНК является следствием, а не причиной дифференцировки.)
3. Существуют виды мРНК, синтез которых регулируется в ходе развития. Можно сказать, что эта мРНК продуцируется только определенными клетками на определенных стадиях развития (это не означает, что все виды мРНК регулируются подобным образом или что все развитие определяется дифференциальной транскрипцией генов).

В итоге мы получаем парадигму дифференциальной экспрессии генов: дифференцированные клетки содержат одни и те же гены, но экспрессия этих генов регулируется таким образом, что разные клетки синтезируют разные белки. В оставшихся главах этой части будут рассмотрены механизмы, с помощью которых дифференциальная экспрессия генов осуществляется во времени и пространстве.

ЛИТЕРАТУРА

- Ashburner M. (1972). Patterns of puffing activity in the salivary glands of *Drosophila*. IV. Induction by ecdysone in salivary glands of *D. melanogaster* cultured in vitro. *Chromosoma* **38**, 255–281.
- Ashburner M., Berondes H.D. (1978). Puffing of polytene chromosomes. In: *The Genetics and Biology of Drosophila*, Vol. 2B. Academic Press, New York, pp. 316–395.
- Barnett T., Pacht C., Gergen J.P., Wensink P.C. (1980). The isolation and characterization of *Drosophila* yolk protein genes. *Cell* **21**, 729–738.
- Becker H.J. (1959). Die Puffs der Speicheldrüsenchromosomen von *Drosophila melanogaster*. I. Beobachtungen zum Verhalten des Puffmusters im Normalstamm und bei zwei Mutanten, giant–und lethal–giant larvae. *Chromosoma* **10**, 654–678.
- Beermann W. (1952). Chromomerenkonstanz und spezifische Modifikationen der Chromosomenstruktur in der Entwicklung und Organdifferenzierung von *Chironomus tentans*. *Chromosoma* **5**, 139–198.
- Beermann W. (1961). Ein Balbiani-ring als Locus einer Speicheldrüsen-Mutation. *Chromosoma* **12**, 1–25.
- Beermann W. (1963). Cytological aspects of information transfer in cellular differentiation. *Am. Zool.* **3**, 23–28.
- Bernard O., Hozumi N., Tonegawa S. (1978). Sequences of mouse immunoglobulin light chain genes before and after somatic change. *Cell* **15**, 1133–1144.
- Blattner F.R., Blechl A.E., Denniston-Thompson K., Faber H.E., Richards J.E., Slightom J.L., Tucker P.W., Smithies O. (1978). Cloning human fetal γ globin and mouse α type globin DNA: Preparation and screening of shotgun collections. *Science* **202**, 1279–1283.
- Bonner J.T., Pardue M.L. (1977). Ecdysone-stimulated RNA synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Assay by *in situ* hybridization. *Cell* **12**, 219–225.
- Borst P., Greaves D.R. (1987). Programmed gene rearrangements altering gene expression. *Science* **235**, 658–667.
- Brack C., Hiram M., Lenhard-Schuller R., Tonegawa S. (1978). A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination. *Cell* **15**, 1–14.
- Brown J.E., Weiss M.C. (1975). Activation of production of mouse liver enzymes in rat hepatoma–mouse lymphoid hybrids. *Cell* **6**, 481–493.
- Burnett F.M. (1959). *The Clonal Selection Theory of Immunity*. Vanderbilt Press, Nashville.
- Capecci M.R. (1980). High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell* **22**, 479–488.
- Clever U. (1966). Induction and repression of a puff in *Chironomus tentans*. *Dev. Biol.* **14**, 421–438.
- Cohen S.N., Chang A.C.Y., Boyer H.W., Helling R.B. (1973). Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 3240–3244.
- Constantini F., Chada K., Magran J. (1986). Correction of murine β -thalassemia by gene transfer into the germ line. *Science* **233**, 1192–1194.
- Cory S., Jackson J., Adams J.M. (1980). Deletions in the constant region locus can account for switches in immunoglobulin heavy chain expression. *Nature* **285**, 450–456.
- Crews S., Griffin J., Huang H., Calame K., Hood L. (1981). A single V_H gene segment encodes the immune response to phosphorylcholine: Somatic mutation is correlated with the class of the antibody. *Cell* **25**, 59–66.
- Daneholt B., Case S.T., Hyde J., Nelson L., Weislander L. (1976). Production and fate of Balbiani ring products. *Prog. Nucleic Acid Res.* **19**, 319–334.
- Davis M.M., Calame K., Early P.W., Livant D.L., Joho R., Weissman I.L., Hood L. (1980a). An immunoglobulin heavy

- chain gene is formed by at least two recombinational events. *Nature* **283**, 733–739.
- Davis M. M., Kim S. K., Hood L. (1980b). Immunoglobulin class switching: Developmentally regulated DNA rearrangements during differentiation. *Cell* **22**, 1–2.
- Edelman G. M. (1970). The structure and function of antibodies. *Sci. Am.* **223**(2), 34–42.
- Fujimoto S., Yamagishi H. (1987). Isolation of an excision product of T-cell receptor α -chain gene rearrangements. *Nature* **327**, 242–243.
- Gehring W. J., Paro R. (1980). Isolation of a hybrid plasmid with homologous sequences to a transposing element of *Drosophila melanogaster*. *Cell* **10**, 897–904.
- Gillam S., Astell C. R., Smith M. (1980). Site specific mutagenesis using oligodeoxyribonucleotides: Isolation of a phenotypically silent ϕ X174 mutant, with a specific nucleotide deletion, at a very high frequency. *Gene* **12**, 129–137.
- Gossler A., Doetschman T., Korn R., Serfling E., Kemler R. (1986). Transgenesis by means of blastocyst-derived stem cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 9065–9069.
- Green M. M. (1980). Transposable elements in *Drosophila* and other diptera. *Annu. Rev. Genet.* **14**, 109–120.
- Grossbach U. (1973). Chromosome puffs and gene expressions in polytene cells. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **38**, 619–627.
- Haber J. E., Rogers D. T., McCusker J. H. (1980). Homothallic conversions of yeast mating types occur by intrachromosomal recombination. *Cell* **22**, 277–289.
- Hoeijmakers J. H. J., Frasch A. C. C., Bernards A., Borst P., Cross G. A. M. (1980). Novel expression-linked copies of the genes for variant surface antigens in trypanosomes. *Nature* **284**, 78–80.
- Hozumi N., Tonegawa S. (1976). Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 3628–3632.
- Jamrich J., Sargent T. D., Dawid I. (1985). Altered morphogenesis and its effects on gene activity in *Xenopus laevis* embryos. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **50**, 31–35.
- Kelly R. G., Cozart N., Deutscher M. P., Lehman I. R., Kornberg A. (1970). Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* **245**, 39.
- Lambert B. (1972). Repeated DNA sequences in a Balbiani ring. *J. Mol. Biol.* **72**, 65–75.
- Lambert B., Daneholt B. (1975). Microanalysis of RNA from defined cellular components. *Methods Cell Biol.* **10**, 17–47.
- Lang R. A., Metcalf D., Gough N. M., Dunn A. R., Gonda T. J. (1985). Expression of a hemopoietic growth factor cDNA in a factor-dependent cell line results in autonomous growth and tumorigenicity. *Cell* **43**, 531–542.
- Lynn D. A., Angerer L. M., Bruskin A. M., Levin W. H., Angerer R. C. (1983). Localization of a family of mRNAs in a single cell type and its precursors in sea urchin embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 2656–2660.
- McCarthy B. J., Hoyer B. H. (1964). Identity of DNA and diversity of messenger RNA molecules in normal mouse tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **52**, 915–922.
- McClintock B. (1952). Chromosome organization and genic expression. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **16**, 13–47.
- Morgan T. H. (1927). *Experimental Embryology*. Columbia University Press, New York.
- Nathans D., Smith H. O. (1975). Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules. *Annu. Rev. Biochem.* **44**, 273–293.
- Pardue M. L., Gall J. G. (1970). Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science* **168**, 1356–1358.
- Perucho M., Hanahan D., Wigler M. (1980). Genetic and physical linkage of exogenous sequences in transformed cells. *Cell* **22**, 309–317.
- Peterson J. A., Weiss M. C. (1972). Expression of differentiated functions in hepatoma cell hybrids: Induction of mouse albumin production in rat hepatoma–mouse fibroblast hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 571–575.
- Peterson R. A. (1977). The position hypothesis for controlling elements in maize. In A. I. Buckhari, J. A. Shapiro and S. L. Adhya (eds.), *DNA Insertion Elements, Plasmids, and Episomes*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, p. 429.
- Peterson R. A. (1980). Instability among the components of a regulatory element transposon in maize. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **45**, 447–455.
- Rabbits T. H., Forster A., Dunnick W., Bentley D. L. (1980). The role of gene deletion in the immunoglobulin heavy chain switch. *Nature* **283**, 351–356.
- Rigby P. W. J., Dieckmann M., Rhodes C., Berg P. (1977). Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity by in vitro nick-translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* **113**, 237–251.
- Robins D. M., Ripley S., Henderson A. S., Axel R. (1981). Transforming DNA integrates into the host chromosome. *Cell* **23**, 29–39.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463–5467.
- Sargent T. D., Dawid I. (1986). Differential gene expression in the gastrula of *Xenopus laevis*. *Science* **222**, 135–139.
- Savakis C., Ashburner M. (1985). A simple gene with a complex pattern of transcription: The alcohol dehydrogenase gene of *Drosophila melanogaster*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **50**, 505–514.
- Seidman J. G., Max E. E., Leder P. (1979). A k-immunoglobulin gene is formed by site-specific recombination without further somatic mutation. *Nature* **280**, 370–375.
- Slightom J. L., Blechl A. E., Smithies O. (1980). Human fetal γ^G and γ^A globin genes: Complete nucleotide sequences suggest that DNA can be exchanged between these duplicated genes. *Cell* **21**, 627–638.
- Smith M. (1985). In vitro mutagenesis. *Annu. Rev. Genet.* **19**, 423–462.
- Southern E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503–517.
- Spradling A. C., Rubin G. M. (1982). Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science* **218**, 341–347.
- Strathern J. N., Newton C. S., Herskowitz I., Hicks J. B. (1979). Isolation of a circular derivative of yeast chromosome. III. Implications for the mechanism of mating type interconversion. *Cell* **18**, 309–319.
- Todaro G. J., DeLarco J. E., Nissley S. P., Rechler M. M. (1977). MSA and EGF receptors on sarcoma virus-transformed cells and human fibrosarcoma cells in culture. *Nature* **267**, 526–528.
- Wagner T. E., Hoppe P., Jollick J. D., Scholl D. R., Hodinka R. L., Gault J. B. (1981). Microinjection of rabbit β -globin gene into zygotes and its subsequent expression in adult mice and offspring. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 6376–6380.
- Wallace H., Birnstiel M. O. (1966). Ribosomal cistrons and the nucleolar organizer. *Biochim. Biophys. Acta* **14**, 296–310.
- Watson J. D., Tooze J., Kurtz D. T. (1983). *Recombinant DNA: A Short Course*. Freeman, New York.
- Weislander L., Daneholt B. (1977). Demonstration of Balbiani ring RNA sequence in polysomes. *J. Cell Biol.* **73**, 260–264.
- Wetmur J. G., Davidson N. (1968). Kinetics of renaturation of DNA. *J. Mol. Biol.* **31**, 349–370.
- Yaoita Y., Honjo T. (1980). Deletion of immunoglobulin heavy chain genes from expressed allelic chromosome. *Nature* **286**, 850–853.

Глава 11

Регуляция экспрессии генов на уровне транскрипции: изменение транскрипции в ходе развития

В то время как мой спутник с важностью и удовлетворением созерцал великолепный вид предметов, я наслаждалась исследованием их сущности... Любопытство, искренние попытки изучить скрытые законы природы, радость, близкая к восторгу, когда они раскрывались передо мной, — одни из самых ранних впечатлений, которые сохранились в моей памяти.

МЭРИ УОЛСТОНКРАФТ ШЕЛЛИ (1817)

Следовательно, мы не можем с категоричностью отрицать, что в конце концов нам удастся измельчать гены в ступке и готовить их в стакане.

Г. МЕЛЛЕР (1922)

Введение

Любую научную дисциплину определяют проблемы, которыми она занимается. До двадцатых годов эмбриология и генетика представляли собой одну науку и многие исследователи, которых мы считаем теперь пионерами генетики, исходно занимались эмбриологией. Однако в двадцатых годах генетики начали формулировать свои проблемы как имеющие отношение к *передаче* наследственных потенциалов, тогда как эмбриологи видели свои проблемы в том, что касается *выражения* этих наследственных черт. Две научные дисциплины разделились и создали свои собственные методики получения данных, наборы проблем, журналы и терминологию.

Многие биологи считали такое деление неестественным, однако не было теории, которая связывала бы эти области науки. Ф. Лилли, чьи работы произвели революцию в изучении оплодотворения (область, где сходились интересы и генетиков, и эмбриологов!), признавал с сожалением, что объединение вновь этих двух дисциплин невозможно до тех пор, пока мы не сможем понять, каким образом ядра, содержащие идентичные гены, обеспечивают развитие различных типов клеток. «Дилемма, к которой мы пришли, представляется в настоящее время неразрешимой» (Lillie, 1927).

Но так ли было в действительности? Ганс Дриш

в 1894 г. предложил гипотезу взаимодействия ядер (которые, как он считал, содержат наследственные потенциалы) и цитоплазмы. Согласно этой гипотезе (представленной в гл. 8), цитоплазма активирует ядро, которое в результате этого образует новые материалы для цитоплазмы. Эта новая цитоплазма будет по-иному взаимодействовать с ядром, и таким образом цикл будет продолжаться.

Следующим летом Дриш осуществил серию экспериментов совместно с Т. Морганом, молодым эмбриологом из Америки, который приехал в Европу для работы с ним. В 1934 г. после принесших ему славу открытий в генетике Морган по-новому изложил идеи Дриша. Вместо общепринятого представления о том, что каждый ген должен быть активен в каждой клетке, Морган высказал предположение, что в клетках различных типов цитоплазма активирует разные «батареи генов». При дроблении яйцо делится таким образом, что разные ядра попадают в разные области цитоплазмы яйца. «Исходные различия областей протоплазмы могут, предположительно, влиять на активность генов. Гены в свою очередь будут влиять на протоплазму, которая дает начало новой серии реципрокных реакций. Подобным образом мы можем представить себе постепенное усложнение и дифференцировку различных частей зародыша».

В шестидесятых годах в пользу этой гипотезы было накоплено достаточно много данных и активация генов стала рассматриваться в основном как процесс избирательной транскрипции генов. Кроме того, изучение дифференциальной экспрессии генов у бактерий, казалось, подтверждает, что при дифференцировке клеток транскрипционно активируются разные наборы генов. Однако сегодня мы знаем, что регуляция экспрессии генов осуществляется разнообразными путями и что контроль может происходить на уровнях транскрипции, процессинга РНК, трансляции и модификации белка. В этой главе мы познакомимся с некоторыми генами, активность которых контролируется дифференциальной транскрипцией. Среди них – гены, активные в большинстве клеток (такие, как рибосомные гены), и гены, продукты которых характеризуют только определенные типы клеток (такие, как гены овальбумина и глобулинов). В следующей главе основное внимание мы уделим механизмам контроля транскрипции, чтобы выяснить, каким образом одни участки хроматина активируются, тогда как другие остаются репрессированными.

Гетерохроматин

Различают два основных типа хроматина в зависимости от степени его конденсации в интерфазном ядре. Большая часть хромосомного материала во время интерфазы находится в деконденсированном состоянии и утрачивает способность окрашиваться; именно эта способность позволяет наблюдать его в виде индивидуальных хромосом. Такой слабоконденсированный материал называют **эухроматином**. Однако некоторые хромосомные области не подвергаются деконденсации, а сохраняют свою плотную упаковку и способность к окрашиванию на протяжении всей интерфазы. Этот материал называют **гетерохроматином**. Гетерохроматин обнаруживается у всех представителей животных и растений и помимо сродства к красителям обладает рядом других свойств, которые отличают его от эухроматина. Во-первых, гетерохроматин относительно, если не полностью, неактивен в синтезе РНК. Во-вторых, гетерохроматин представляет собой фракцию ДНК, которая реплицируется последней в ходе клеточного цикла. И, в-третьих, гетерохроматин подавляет кроссинговер между хроматидами в ходе мейоза.

Существуют два типа гетерохроматина: конститутивный и факультативный. **Конститутивный гетерохроматин** располагается всегда в одних и тех же положениях на обеих хромосомах из пары гомологов. Обычно его обнаруживают в центромерах, и он часто состоит из высокоповторяющихся последовательностей ДНК. **Факультативный гетерохрома-**

тин формируется при конденсации хроматина на определенных стадиях жизненного цикла организма и обычно присутствует лишь в одной хромосоме из пары гомологов. Иными словами, на каком-либо этапе развития определенные области ДНК становятся неактивными в транскрипции благодаря их конденсации в гетерохроматин. Было показано, что образование факультативного гетерохроматина отражает широкораспространенный механизм регуляции генов. Мы рассмотрим его особенности у насекомых и млекопитающих.

Отцовский гетерохроматин у мучнистого червеца

Один из наиболее впечатляющих примеров факультативной гетерохроматизации обнаружен у самцов мучнистого червеца *Planococcus citri* (рис. 11.1). У самок этого вида нет факультативного гетерохроматина. У самцов, напротив, весь отцовский гаплоидный набор хромосом целиком становится гетерохроматином. Даже если у отца данный набор хромосом был эухроматиновым, он становится гетерохроматиновым, когда передается самцу следующего поколения. В итоге самец *Planococcus* имеет эухроматиновый набор хромосом, полученный от матери, и гетерохроматиновый гаплоидный набор, полученный от отца. В ходе мейоза у самца гетерохроматиновые хромосомы дезинтегрируются, оставляя для упаковки в спермии только эухроматиновые хромосомы. Если потомок окажется самцом, то эти хромосомы конденсируются.

В результате этого у самцов червеца экспрессируются только материнские гены (за исключением тех немногих тканей самца, в которых гетерохроматизация носит обратимый характер). Эта генетическая инертность отцовского набора хромосом у самцов была изящно показана в работе, в которой самцов и самок червеца облучали и затем скрещивали с необлученными особями (Brown, Nelson-Rees, 1961). При скрещивании облученных самок в потомстве наблюдалась высокая смертность и среди самцов, и среди самок. Этот результат свидетельствовал о том, что γ -лучи способны вызывать летальные мутации. В потомстве же облученных самцов наблюдалась низкая смертность самцов и высокая – самок. Гетерохроматизация облученных хромосом у мужского потомства предотвращала экспрессию доминантных летальных мутаций.

Инактивация X-хромосомы у млекопитающих

У млекопитающих факультативный гетерохроматин проявляется в феномене инактивации X-хро-

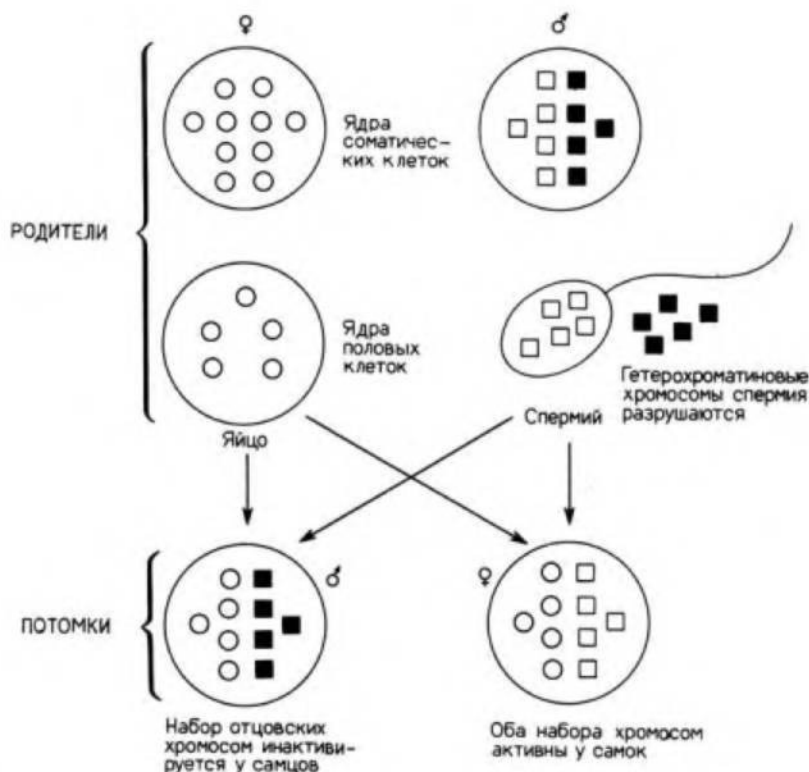


Рис. 11.1. Гетерохроматизация отцовских хромосом у самцов мучнистого червеца. Самец мучнистого червеца становится функционально гаплоидным, и в сперматозоиде оказываются только гетерохроматинные хромосомы. Эти хромосомы становятся гетерохроматинными, если потомок окажется самцом.

мосомы. В 1949 г. Барр и Бертрам (Barr, Bertram, 1949) обнаружили в ядрах нейронов кошки интенсивно окрашенные тельца, расположенные вблизи ядерной оболочки. Позже эти тельца, названные **тельцами Барра**, были обнаружены у самок многих млекопитающих, в том числе и у человека; было показано, что они представляют собой неактивную X-хромосому (рис. 11.2). Это означает, что, хотя в клетках самок содержатся две X-хромосомы, а в клетках самцов — только одна, у самок транскрипционно активна может быть лишь одна X-хромосома. Этот феномен называют **компенсацией дозы гена**.

В одной из наиболее ранних работ по инактивации X-хромосомы изучали закономерности окраски мышей (Mary Lyon, 1961). Если пигментация волосяного покрова определяется аутосомным геном, то окраска мыши будет либо такой, как у одного из родителей, либо промежуточной. В любом случае мышь будет одноцветной. Однако если самка мыши гетерозиготна по X-сцепленному гену окраски, то результат будет совершенно иной: она будет пятнистой (рис. 11.3). Для объяснения этого феномена исследовательница предложила следующую гипотезу: 1) В ходе раннего развития самок млекопитающих обе X-хромосомы активны. 2) Впоследствии



Рис. 11.2. Ядра эпителиальных клеток гортани человека, окрашенные фиолетовым крезилем. А. Клетка нормального самца XY не содержит тельца Барра. Б. Клетка нормальной самки XX содержит одно тельце Барра (указано стрелкой). В. Клетка самки с тремя X-хромосомами. Можно видеть два тельца Барра; только одна X-хромосома активна в клетке. (Из Moore, 1977.)

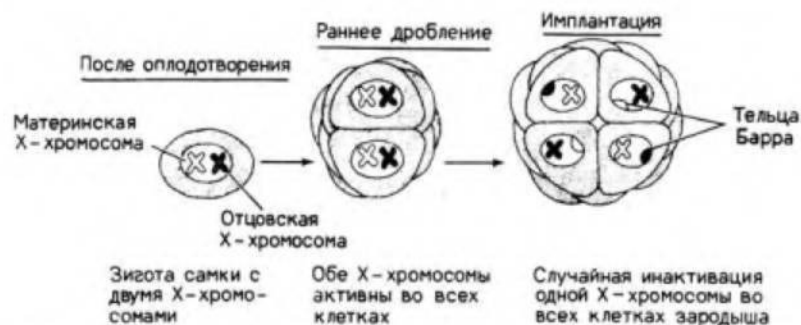


Рис. 11.3. Инактивация X-хромосомы у млекопитающих. А. Схема, иллюстрирующая случайную инактивацию X-хромосомы. Предполагается, что инактивация происходит в период имплантации. Б. Самка мыши, гетерозиготная по гену окраски *dappled*, связанному с X-хромосомой. Видны участки с резко различающейся пигментацией. (Фотография с любезного разрешения M. F. Lyon.)

одна из X-хромосом в каждой клетке выключается. 3) Эта инактивация происходит случайным образом. В одних клетках инактивируется отцовская X-хромосома, тогда как в других – материнская. 4) Этот процесс является необратимым. Коль скоро X-хромосома инактивировалась, она будет неактивной у всех потомков этой клетки. (Участки пигментации у этих мышей достаточно большие.) Таким образом, все ткани у самок млекопитающих являются мозаиками из клеток двух типов.

Некоторые из наиболее убедительных данных в пользу этой модели были получены в биохимических экспериментах с клонами клеток человека. Существует наследственная болезнь человека, называемая синдромом Леша–Найхана; эта болезнь характеризуется отсутствием фермента гипоксантинфосфорибозилтрансферазы (ГФРТ), синтез которого контролируется X-хромосомой. Синдром Леша–Найхана передается с X-хромосомой. Это означает, что мужчины, несущие соответствующую мутацию в своей единственной X-хромосоме, заболевают и умирают от этой болезни. У женщин присутствие мутантного гена ГФРТ может маскироваться другой X-хромосомой, которая несет аллель дикого типа. Женщина, у которой имеются сыновья, страдающие этой болезнью, является переносчиком, поскольку у нее имеется мутантный ген ГФРТ на одной X-хромосоме и ген ГФРТ дикого типа на другой X-хромосоме. Если представленная выше гипотеза правильна, то у такой женщины

клетка должна синтезировать либо активный, либо неактивный фермент ГФРТ в зависимости от того, какая X-хромосома функционирует. Для проверки этого положения индивидуальные клетки кожи, взятые от женщины, гетерозиготной по гену ГФРТ, помещали в культуральную жидкость (Barbara Migeon, 1971). Каждая из этих клеток делилась, образуя клон. При окрашивании этих клонов на присутствие ГФРТ дикого типа было выявлено, что примерно половина клонов содержала этот фрагмент, а половина – нет (рис. 11.4).

Еще один ген X-хромосомы кодирует глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу (Г6ФДГ). У этого фермента имеются обычно два электрофоретических варианта: Г6ФДГ-А и Г6ФДГ-В. Для мужчин характерен вариант А либо В, тогда как женщины в отношении фенотипа по этому ферменту могут быть А, В или АВ. В клетках кожи гетерозиготных женщин обнаруживаются оба варианта Г6ФДГ (рис. 11.5). Однако изолированные клоны, полученные после клонирования индивидуальных клеток кожи от этих гетерозигот, экспрессируют только один из двух возможных вариантов. Ни один из клонов не экспрессировал оба варианта (Davidson et al., 1963).

Гипотеза об инактивации X-хромосомы прекрасно объясняет дифференциальную инактивацию генов на уровне транскрипции. О ее важности дополнительно свидетельствовали некоторые интересные исключения из общих правил. Во-первых, гипотеза оказалась справедливой в отношении *сома-*

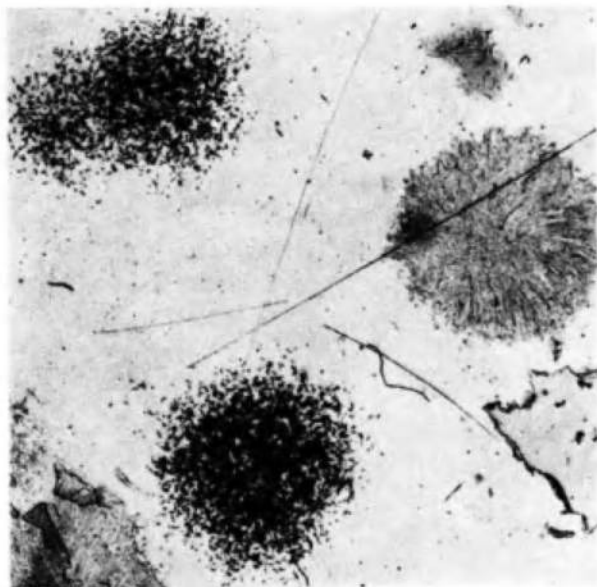


Рис. 11.4. Устойчивая инактивация X-хромосомы. Приблизительно 30 клеток от женщины, гетерозиготной по гену, обуславливающему недостаточность фермента ГФРТ, помещали в чашку Петри для культивирования. Клетки визуализировали с помощью радиоавтографии после инкубации в среде, содержащей радиоактивный гипоксантин. Клетки, содержащие ГФРТ, включают радиоактивные соединения в свою РНК и засвечивают фотографическую эмульсию, нанесенную поверх них. Клоны клеток без ГФРТ выглядят более светлыми, так как их клетки не могут включать радиоактивные соединения. (Из Migeon, 1971; фотография с любезного разрешения B. Migeon.)

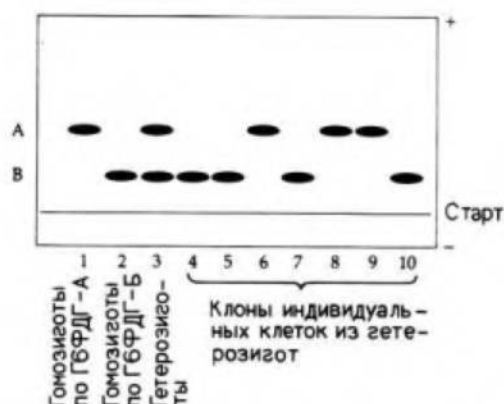


Рис. 11.5. Две популяции клеток у женщин. Электрофорез препаратов, полученных из клеток кожи женщины, гетерозиготных по гену Г6ФДГ, показывает, что синтез происходит на обеих хромосомах, но на разных хромосомах в различных клетках. В культивированных гетерозиготных клетках кожи (дорожка 3) содержатся ферменты обоих типов. Однако в каждом клоне индивидуальных клеток кожи (дорожки 4–10) наблюдается только одна форма фермента.

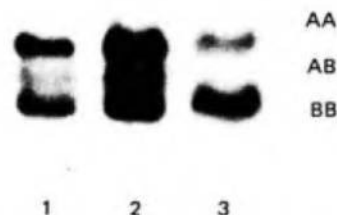


Рис. 11.6. В ооцитах млекопитающих обе X-хромосомы активны. Электрофорез клеток из яичников (дорожки 1 и 2) и легкого (дорожка 3) 14-недельного плода человека, гетерозиготного по Г6ФДГ. Клетки легкого экспрессируют А (АА)- и В (ВВ)-формы фермента, тогда как клетки яичника содержат также гетеродимер (АВ). Выраженные А- и В-зоны в случае яичников отражают тот факт, что клетки собственно яичников экспрессируют только А- и В-формы фермента, а гетеродимер экспрессируется только в ооцитах. (Фотография с любезного разрешения B. Migeon.)

мических клеток. В женских половых клетках неактивная X-хромосома реактивируется незадолго до вхождения клеток в мейоз (Kratzer, Chapman, 1981; Gartler et al., 1980). Таким образом, в зрелых ооцитах обе X-хромосомы оказываются активными. Это показано на рис. 11.6. Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа является димерным ферментом, поэтому каждая соматическая клетка содержит ферменты, построенные из двух А-субъединиц или из двух В-субъединиц. У гетерозиготной самки в одних клетках будет содержаться фермент, состоящий из двух А-субъединиц, тогда как в других – состоящий из двух В-субъединиц (в зависимости от того, какая X-хромосома активна в конкретной клетке). Однако если в одной и той же клетке активны обе X-хромосомы, то следует ожидать появления молекул этого фермента, состоящих из одной А-субъединицы и одной В-субъединицы. Именно это наблюдается в ооцитах (Gartler et al., 1973; Migeon, Jalalian, 1977). В них обнаруживается АВ-гетеродимер, что свидетельствует о транскрипционной активности в одной и той же клетке обеих X-хромосом.

Вторая группа исключений касается случайного характера инактивации X-хромосом. Правило случайности справедливо, однако иногда наблюдается предпочтительная инактивация отцовской X-хромосомы. В тканях трофобласта самки мыши (у человека наблюдается иная ситуация) экспрессия материнской X-хромосомы доминирует в такой степени, что отцовская X-хромосома практически не экспрессируется. У сумчатых отцовская X-хромосома также предпочтительно инактивируется во всех тканях зародыша (Sharman, 1971; Cooper et al., 1971). Мы пока не знаем, почему так происходит, но выяснение этого вопроса может оказаться ключе-

Дополнительные сведения и гипотезы

Определение времени инактивации X-хромосомы

Инактивация одной из двух X-хромосом млекопитающих в разных тканях происходит в разное время. В пределах зародыша эта инактивация происходит во всех клетках эпибласта до дифференцировки тканей (Nesbitt, 1974; Gartler, Riggs, 1983). Такая инактивация X-хромосомы наблюдается также в клетках тератокарциномы. Как упоминалось в гл. 6, эти клетки напоминают ранние бластомеры внутренней клеточной массы тем, что являются тотипотентными и могут дифференцироваться в клетки других типов. В стволовых клетках тератокарциномы обе X-хромосомы активны, но при дифференцировке этих клеток одна из X-хромосом в каждой клетке становится поздно реплицирующейся и транскрипционно инертной (McBurney, Strutt, 1980).

В отличие от этого во внезародышевых тканях инактивация X-хромосомы может происходить случайным образом и в различное время. Впервые инактивацию X-хромосомы наблюдали в трофичес-

кой эктодерме мыши, где специфически инактивируется X-хромосома, полученная от отца (Tagaki, 1974; West et al., 1977). Этот пример напоминает ситуацию у самок сумчатых, у которых отцовская X-хромосома инактивируется во всем зародыше (Cooper et al., 1971; Samollow et al., 1987). У мыши последующая инактивация X-хромосомы происходит в тканях гипобласта и затем, наконец, в эпибласте зародыша (Monk, Harper, 1979). На рис. 11.7 показан цикл инактивации X-хромосомы у мыши.

То, что инактивация X-хромосомы происходит подобным образом в плаценте мыши, вовсе не означает, что аналогичным образом она происходит в плаценте всех других млекопитающих.¹ В вор-

¹ Оказался в заблуждении даже Леонардо да Винчи. На его известном рисунке человеческого плода изображена плацента теленка, а не человека. Как отметил один исследователь (Renfree, 1982), этот рисунок служит предостережением тем, кто склонен к некритичной экстраполяции данных от одного вида млекопитающих к другому.

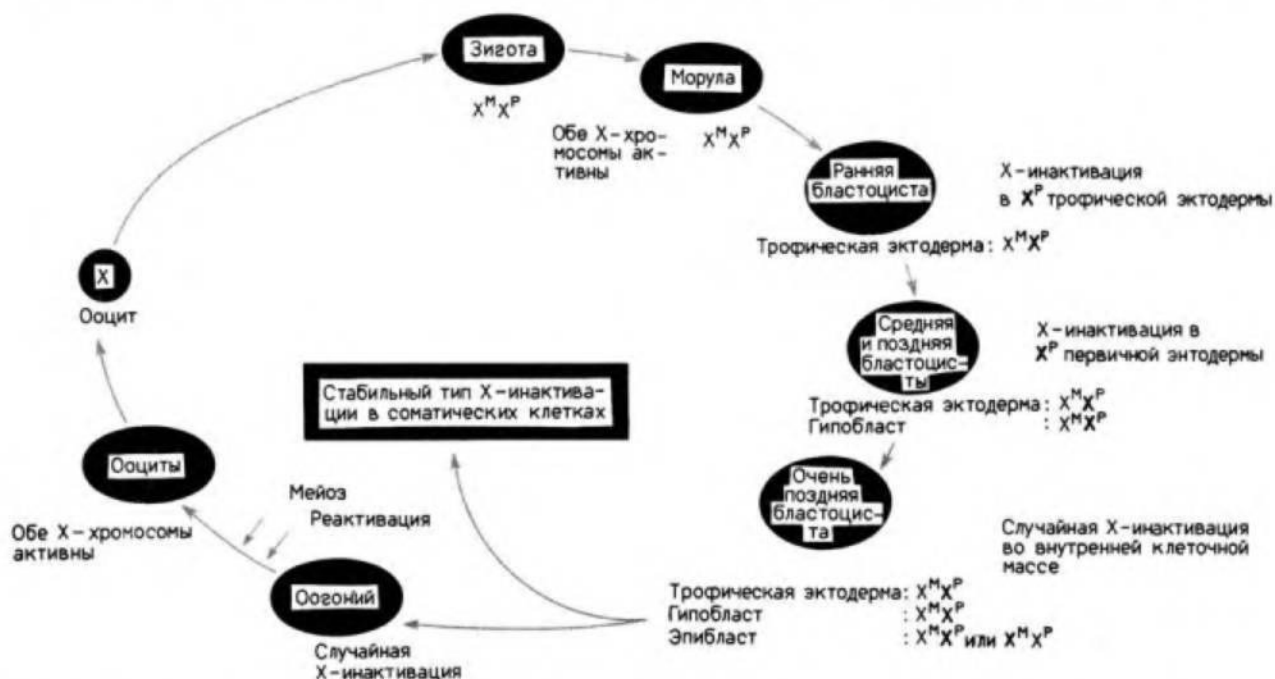


Рис. 11.7. Цикл инактивации X-хромосомы у мыши. X^M и X^P — соответственно материнская и отцовская X-хромосомы. Неактивное состояние обозначено жирным символом. Примордиальные первичные половые клетки перед тем, как они мигрируют в гонады, имеют конденсированную X-хромосому (предположительно инактивированную); обе X-хромосомы становятся активными вскоре после того, как первичные половые клетки мигрируют в гонады (Witschi, 1957; Kratzer, Chapman, 1981). (По Gartler, Riggs, 1983.)

синках хориона человека некоторые клетки содержат две активные X-хромосомы, а те X-хромосомы, которые инактивированы, могут реактивироваться (Migeon et al., 1985, 1986). Кроме того, инактивация X-хромосом в плаценте человека носит случайный

характер; может быть выключена любая X-хромосома — отцовская или материнская.

В следующей главе мы обсудим молекулярный механизм поддержания транскрипционной инертности одной из двух X-хромосом.

вым этапом на пути к пониманию механизма инактивации X-хромосомы.

В-третьих, инактивация X-хромосомы может не распространяться на всю длину хромосомы. Почти все известные гены X-хромосомы картированы на ее длинном плече. Однако у человека ген сульфатазы стероидов расположен на коротком плече X-хромосомы. Оказалось, что этот локус не инактивируется (Mohandas et al., 1980). Таким образом, гетерохроматизация может не распространяться целиком на всю X-хромосому.

Четвертое исключение на самом деле подтверждает правило. Окраску волосяного покрова у самцов некоторых млекопитающих можно объяснить лишь в том случае, если у этих животных происходит инактивация X-хромосомы. К числу таких примеров относятся мозаичные и черепаховые коты. Характерная пятнистая окраска наблюдается обычно у кошек, и это рассматривается как следствие описанных выше правил. Но в редких случаях пятнистая окраска обнаруживается также у котов. Как это может происходить? Оказалось, что такие коты имеют генотип XXУ. Имеющаяся Y-хромосома обуславливает их мужской пол (см. гл. 21), но, как и у кошек, одна X-хромосома у этих котов инактивируется (Centerwall, Benirschke, 1973). Таким образом, в клетках этих котов содержатся тельца Барра, сохраняющиеся после случайной инактивации одной из X-хромосом. Исходя из всего сказанного, становится очевидным, что один из механизмов регуляции генов на уровне транскрипции заключается в переводе большого числа генов в гетерохроматин и, следовательно, в транскрипционно инертное состояние.

Амплифицированные гены

Амплификация генов рибосомной РНК

Одна из стратегий для транскрипции огромного количества определенной РНК заключается в образовании существенно большего количества копий данного гена. Этой стратегией пользуются лишь в редких случаях и главным образом для амплификации генов рибосомной РНК у насекомых и амфибий, а также генов хориона (оболочки яйца) у некоторых насекомых, например у дрозофилы. Во

многих отношениях рибосому можно рассматривать как продукт дифференцированной клетки — ооцита. Это особенно справедливо для амфибий, ооциты которых содержат приблизительно в 200 000 раз больше рибосом, чем обычные соматические клетки. Такое число рибосом для одной клетки — феномен действительно впечатляющий. В самом деле, зиготы, в которых отсутствуют ядрышковые организаторы, осуществляющие синтез рибосомной РНК, продолжают развитие, используя запасенные рибосомы вплоть до стадии самостоятельно питающегося головастика (на этой стадии личинки все же погибают из-за отсутствия необходимых для роста рибосом).

В ооцитах амфибий синтез рибосомной РНК происходит в течение продолжительной профазы первого деления мейоза, а именно на длящейся многие месяцы стадии диплотены после спаривания и репликации гомологичных хромосом.

Наиболее изучены гены рибосомной РНК *Xenopus laevis*. Эти гены изображены на рис. 11.8. За 5'-лидерной последовательностью расположена последовательность, кодирующая 18S-рРНК. Далее следуют транскрибируемый спейсер, ген для 5.8S-рРНК, другой транскрибируемый спейсер и затем ген для 28S-рРНК. Внутри этих генов нет интронов, и весь этот набор транскрибируется в 40S-предшественник рРНК, который подвергается затем процессингу с образованием трех рРНК (5S-рРНК синтезируется на другом участке генома; гены 5S-рРНК представлены в геноме тысячами копий и не амплифицированы¹).

Механизм амплификации рибосомных генов

В диплоидной клетке лягушки имеются две гомологичные области генов больших рРНК. Каждая область содержит примерно 450 копий единиц

¹ Повторяющиеся гены — это гены, которые всегда присутствуют в геноме в большом числе копий; этот признак наследуется. Гены 5S-рРНК, представленные тысячами копий на геном, составляют набор повторяющихся генов. Амплифицированные гены — это гены, присутствующие в количестве многих копий только в определенных клетках. Эта множественность не наследуется. Гены для 28S-, 18S- и 5.8S-рРНК — повторяющиеся (около 900 раз на 1 клетку) и амплифицированные (в ооците).

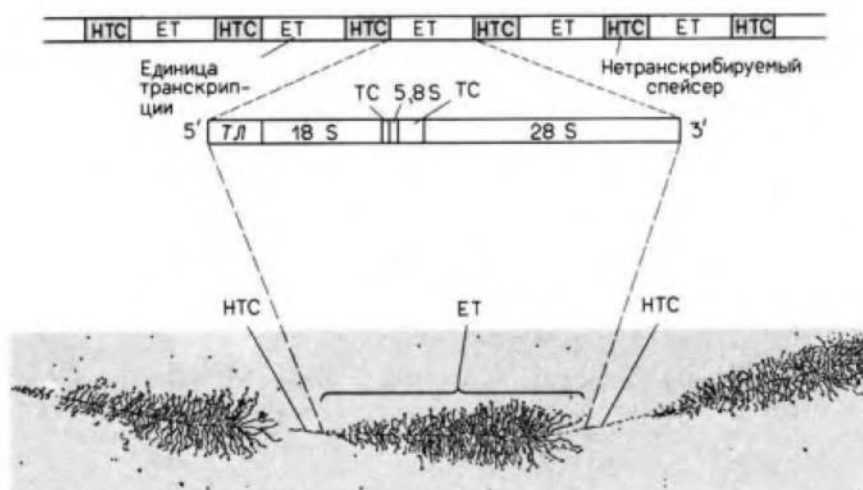


Рис. 11.8. Организация генов для рибосомных 18S-, 5,8S- и 28S-РНК у амфибий. Каждая единица транскрипции (ЕТ) фланкирована участками нетранскрибируемых спейсеров (НТС). Единица транскрипции содержит транскрибируемую лидерную последовательность (ТЛ), ген 18S-рРНК, транскрибируемый спейсер (ТС), ген 5,8S-рРНК, другой транскрибируемый спейсер и ген 28S-рРНК. Под диаграммой показана электронная микрофотография tandemно расположенных генов рРНК, активно транскрибируемых в ооците тритона. В ходе транскрипции размер РНК постепенно увеличивается и одновременно синтезируется большое количество транскриптов. (По Watson, 1976; фотография с любезного разрешения O. L. Miller, Jr.)

транскрипции, описанных в предыдущем разделе, и внутри каждой области эти копии разделены нетранскрибируемыми спейсерами. Все наборы генов рРНК на хромосоме идентичны, а нетранскрибируемые спейсеры даже на одной хромосоме разные по длине на разных участках. Можно было бы ожидать, что ооцит на стадии диплотены (когда репликация ДНК уже закончилась) будет содержать всего 4×450 , или приблизительно 1800 генов, кодирующих рРНК. Но этого явно недостаточно! Вместо нескольких тысяч копий обнаруживается около миллиона генов рРНК. Видны не четыре ядрышка, а тысячи (рис. 11.9). Эти добавочные ядрышки лежат внутри ядра, но не присоединены к какой-либо хромосоме, как обычные ядрышки.

Сравнивая эффективность гибридизации радиоактивной 28S-рРНК ооцита с ДНК соматической клетки, исследователи определили, что в ооците генов рРНК в 1500 раз больше, чем обычно. Если каждое ядрышко содержит 450 копий генов, то общее число генов для предшественников больших рРНК в ооците амфибий можно оценить как $6,8 \times 10^5$. Амплификацию можно изучать также с помощью метода центрифугирования в градиенте хлорида цезия. При центрифугировании фрагментированной ДНК в таком градиенте фрагменты сепарировать в соответствии со своей плавучей плотностью. Плавающая плотность ДНК из соматических клеток *X. laevis* составляет в среднем $1,699 \text{ г} \cdot \text{см}^{-3}$. Распределение по плотности для фрагментирован-

ной ДНК из ооцитов несколько отличается (рис. 11.10). В этом случае наблюдается второй или «сателлитный» пик, обусловленный содержанием ДНК из амплифицированных генов рРНК. Состав осно-

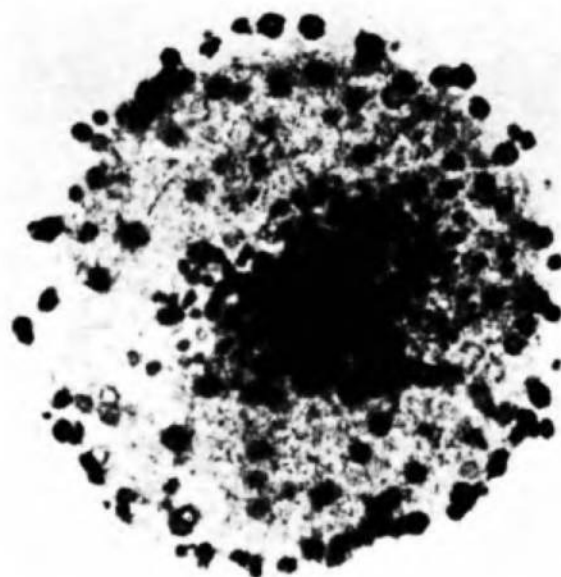


Рис. 11.9. Ядро, изолированное из ооцита *Xenopus laevis*. Темноокрашенные пятна представляют собой экстрахромосомные ядрышки. (Из Brown, Dawid, 1968; фотография с любезного разрешения D. D. Brown.)



Рис. 11.10. Выделение экстрахромосомных (амплифицированных) ядрышек. Из ядер соматических клеток и ядер ооцитов была изолирована ДНК; каждый препарат смешивали со стандартным количеством ДАТ (для нормирования результатов) и центрифугировали в хлориде цезия до достижения равновесия. В обоих случаях основная фракция ДНК имела плотность $1,699 \text{ г} \cdot \text{см}^{-3}$. Помимо этой ДНК в ооцитах содержалась «сателлитная» фракция с большей плотностью. (По Brown, Dawid, 1968.)

ваний этой ДНК придает ей большую плавучую плотность ($1,729 \text{ г} \cdot \text{см}^{-3}$), чем плотность основной массы ДНК *Xenopus*. ДНК из клеток *X. laevis* имеет в среднем 40% ГЦ-пар, тогда как рибосомные гены – 67% ГЦ-пар. Поэтому рибосомные гены характеризуются большей плотностью, чем большинство других генов. В соматических тканях рибосомные гены составляют лишь 0,06% генома и не образуют заметного отдельного сателлитного пика. Однако, когда эти гены амплифицированы в 1500

раз, они образуют зону тяжелой ДНК, легко отличимую от основной зоны. Эта ДНК будет гибридизоваться только с рибосомной ДНК, но не с другими генами. Не вызывает сомнений, что мы наблюдаем специфическую амплификацию гена – амплификацию, которая позволяет транскрибировать чрезвычайно большое количество РНК (Brown, Dawid, 1968).

Следующий интересующий нас вопрос – как происходит амплификация этих генов? И хотя нам неизвестны детали механизма амплификации, мы располагаем некоторыми подходами к его выяснению. Мы знаем, например, что экстрахромосомные ядрышки образуются на стадии пахитены в профазе мейоза непосредственно перед диплотеной. В самом деле, для этой стадии характерна «пахитенная шапочка», которая представляет собой большую массу экстрахромосомной ДНК. Таким образом, добавочные гены синтезируются на стадии пахитены мейоза и транскрибируются на стадии диплотены. Когда ядро ооцита дезинтегрируется в ходе первого деления мейоза, добавочные ядрышки выходят в цитоплазму и разрушаются.

Один из наиболее интересных подходов к механизму амплификации связан с тем, что в каждом отдельном экстрахромосомном ядрышке участки нетранскрибируемых спейсеров имеют одинаковую длину (Wellauer et al., 1976). Однако среди хромосомных кластеров генов в одних и тех же клетках имеется заметная гетерогенность по длине спейсеров, поэтому экстрахромосомные ядрышки не являются простыми копиями всего хромосомного ядрышка. Одна из моделей, с помощью которой можно объяснить образование сотен транскрипционных единиц рибосомных генов, разделенных идентичными нетранскрибируемыми спейсерами, – это модель катящегося кольца. Аналогичный механизм

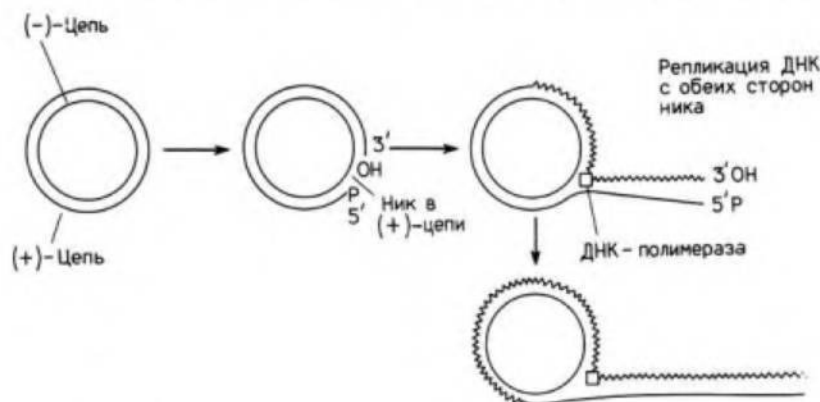


Рис. 11.11. Модель репликации по механизму «катящегося кольца», при которой можно синтезировать много идентичных копий. Кольцо должно содержать одну единицу транскрипции рРНК и один нетранскрибируемый спейсер. С помощью этого механизма могут быть созданы экстрахромосомные ядрышки с одинаковыми по длине участками НТС между генами.

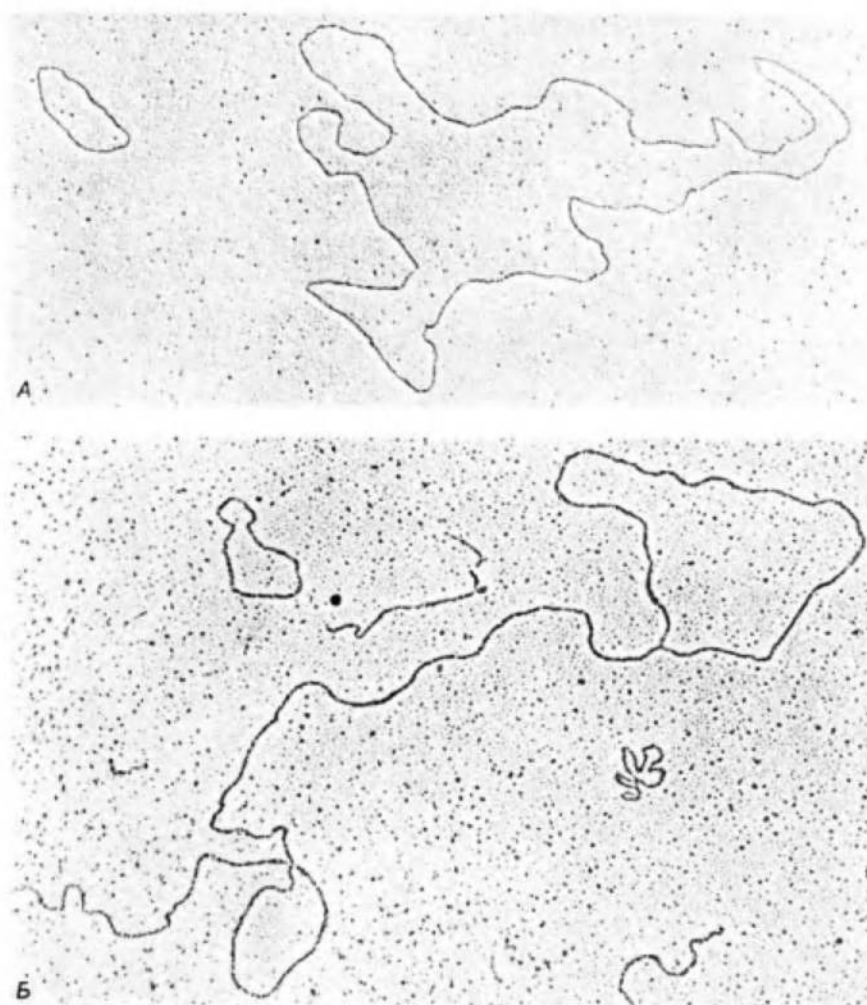


Рис. 11.12. Изолированная экстрахромосомная рРНК из ооцитов *Xenopus laevis*. На электронных микрофотографиях видны кольца (А) и «лариаты» (структуры типа лассо) (Б), что указывает на репликацию по механизму «катящегося кольца». (Из Rochaix et al., 1974; фотография с любезного разрешения А. Bird.)

репликации характерен для многих вирусов. В ооците один набор рибосомных генов каким-то образом отсоединяется от хромосомы и сворачивается в кольцо. В кольцо вводится ник (разрыв одной цепи), и с этого ника начинается синтез ДНК в обоих направлениях. Таким путем могут быть синтезированы идентичные копии рибосомных генов и их спейсеров (рис. 11.11). Электронные микрофотографии амплифицированных генов (Hourcade et al., 1973; Rochaix et al., 1974) подтверждают эту модель. На этих микрофотографиях выявляются замкнутые кольца, типичные для экстрахромосомных ядрышек, а также структуры типа «лариатов» (лассо), которые, по-видимому, представляют собой промежуточные продукты катящегося кольца (рис. 11.12).

Визуализация транскрипции на амплифицированных генах

Первыми генами, которые были выделены и очищены, стали амплифицированные гены рибосомных РНК из ооцитов амфибий. Они оказались также первыми генами, транскрипция которых реально наблюдалась с помощью электронного микроскопа. Зная, что эти гены высокоактивны в отношении транскрипции рРНК на стадии диплотены мейоза, Миллер и Битти (Miller, Beatty, 1969) для разделения петель хроматина перед электронной микроскопией использовали буферы с низкой ионной силой, что приводило к расплетанию колец ДНК и возникновению конфигурации, показанной на рис. 11.8. При

этом ДНК образует осевой стержень, на котором синтезируется рРНК. На каждом участке синтезируется множество цепей рРНК, и ряд таких участков показан на этом рисунке. На каждом участке транскрипция начинается на вершине «рождественской елки» и продолжается до тех пор, пока не будет синтезирован предшественник больших рибосомных РНК. В точке присоединения каждого РНК-транскрипта к ДНК находится молекула РНК-полиме-

разы. Длина РНК в этих больших транскриптах составляет около 7200 оснований, что примерно соответствует ожидаемым размерам предшественника рРНК. Между транскрибируемыми участками ДНК лежат «нетранскрибируемые спейсеры». Электронная микрофотография и в самом деле может дать нам точную картину процесса транскрипции эукариотического гена.

Дополнительные сведения и гипотезы

Молекулярная основа быстрой транскрипции рибосомных генов

Для осуществления транскрипции необходимо взаимодействие РНК-полимеразы с ДНК. Однако далеко не каждый фрагмент ДНК подходит для этого (в противном случае транскрипция могла бы начаться где угодно и клетка заполнилась бы дефектными молекулами мРНК). Участок ДНК, специализированный для связывания РНК-полимеразы, называют **промотором**. В клетках эукариот содержатся РНК-полимеразы трех различных типов, каждый из которых характеризуется определенными свойствами и функцией (Rutter et al., 1976). **РНК-полимераза I** обнаруживается в области ядрышка в ядре и отвечает за транскрипцию больших рРНК. **РНК-полимераза II** транскрибирует предшественники мРНК, а **РНК-полимераза III** транскрибирует малые РНК, такие, как транспортные РНК, рибосомную 5S-РНК и другие небольшие последовательности РНК. Эти полимеразы имеют различную чувствительность к ионным условиям и антибиотикам. Их свойства представлены в табл. 11.1.

Высокая эффективность транскрипции рибосомных генов может быть обусловлена структурой области спейсера между соседними генами рибосомной РНК. Как у большинства генов, промотор, присоединяющий РНК-полимеразу, лежит непосредственно перед (5') кодирующей областью гена.

Однако в отличие от большинства других генов у генов рРНК прямо перед промотором имеется последовательность ДНК, отвечающая за терминацию транскрипции (рис. 11.13). Эта структура (до сих пор обнаруженная только в рибосомных генах млекопитающих и амфибий) может концентрировать молекулы РНК-полимеразы на этих генах. У большинства генов при терминации транскрипции происходит высвобождение РНК и РНК-полимеразы в нуклеоплазму. РНК-полимераза может затем использоваться повторно, если найдет на ДНК новый промоторный сайт. Этот процесс, на который заведомо должно тратиться время, возможно, не осуществляется при транскрипции рибосомных генов. Вместо этого после отделения 40S-предшественника рРНК от гена РНК-полимераза остается на спейсере, синтезируя, вероятно, короткие нестабильные транскрипты (Labhart, Reeder, 1986). Как отмечалось ранее, непосредственно перед промотором находится специальный участок терминации транскрипции. Этот участок взаимодействует с промотором для обеспечения переноса РНК-полимеразы к соседнему гену (McStay, Reeder, 1986; Henderson, Sollner-Webb, 1986; Grummt et al., 1986). Поэтому, коль скоро РНК-полимераза начала транскрипцию рибосомного гена, она переносится затем от одного

Таблица 11.1. Общая классификация РНК-полимераз эукариот

Свойство	РНК-полимераза I	РНК-полимераза II	РНК-полимераза III
Локализация в клетке	Ядрышко	Нуклеоплазма	Нуклеоплазма
Доля клеточной активности, %	50–70	20–40	10
Основной продукт транскрипции	Полимеры больших рРНК	Предшественники мРНК	тРНК и 5S-рРНК
Концентрация α -аманитина, вызывающая 50%-ное ингибирование, $\text{мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$			
полимеразы млекопитающих	> 400	0,025	20
полимеразы насекомых	—	0,03	> 1000
полимеразы дрожжей	600	1,0	> 2000

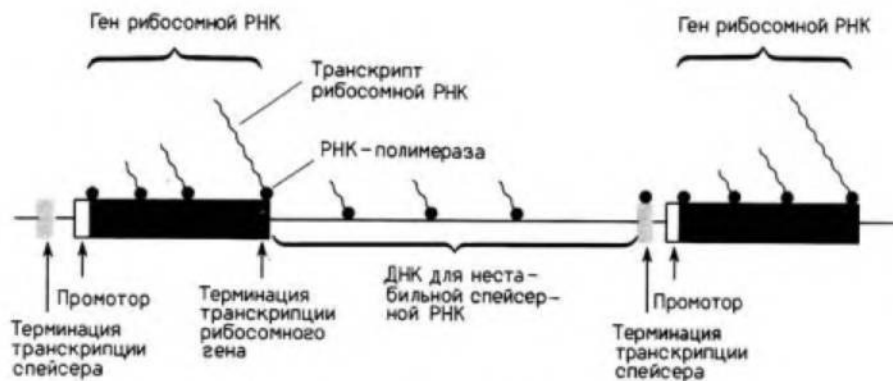


Рис. 11.13. Модель транскрипции рибосомной ДНК с задержкой РНК-полимераз. Показаны два тандемно расположенных гена. Молекула РНК-полимеразы I (обозначена кружком) инициирует и транскрибирует новообразованную РНК. После достижения сайта терминации рРНК полимеразы остается связанной с ДНК и проходит участок спейсера, вероятно транскрибируя короткоживущие РНК. На участке терминатора непосредственно перед (5')-промотором рРНК прекращается синтез спейсерных транскриптов, и полимеразы оказывается готовой для взаимодействия с промотором для инициации транскрипции следующего гена. Существует возможность присоединения новых молекул РНК-полимеразы к промотору или к специфичным участкам внутри спейсера. (По Henderson, Sollner-Webb, 1986.)

гена к другому без вхождения в пул несвязанных полимераз.

Не исключено также, что свободно плавающие молекулы РНК-полимеразы I способны узнавать определенные участки ДНК в спейсерах и вовле-

каться в транскрипцию рибосомной РНК. В этом случае спейсер будет действовать как «зона загрузки», накапливая новые полимеразы для транскрипции генов рибосомной РНК (Moss, 1983; Henderson, Sollner-Webb, 1986).

Гены хориона дрозофилы

Известно, что при синтезе белков хориона у *Drosophila melanogaster* гены хориона также амплифицируются. Белки хориона синтезируются фолликулярными клетками яичника. Перед началом экспрессии генов хориона весь геном фолликулярных клеток проходит дополнительные циклы синтеза ДНК, так что количество ДНК достигает 16 гаплоидных наборов. После этой репликации гены белков хориона реплицируются избирательно еще около десяти раз. Эта амплификация происходит только в фолликулярных клетках яичника (Spradling, Mahowald, 1980).

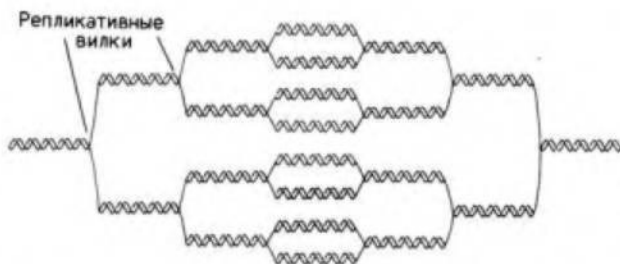


Рис. 11.14. Амплификация генов хориона в пределах хромосомы. Схема локальной амплификации с помощью многократных циклов синтеза ДНК в области, уже содержащей множественные копии генов хориона.

Амплификация обусловлена дополнительными циклами репликации ДНК лишь в определенных областях генома (Spradling, 1981). Эти области ДНК характеризуются наличием нескольких ветвей, каждая из которых содержит амплифицированные гены хориона (рис. 11.14 и 11.15). В данном случае амплификация происходит, но гены остаются присоединенными к хромосомам.

Селективная транскрипция генов

Большинство генов не используют избирательную амплификацию в качестве механизма для обеспечения крупномасштабной экспрессии. В развивающихся эритроцитах, в которых гемоглобин составляет 98% всего синтезируемого белка, не наблюдается избирательной амплификации глобиновых генов. В шелкоотделительной железе гусениц, продуцирующих огромное количество белка шелка фиброина, весь геном амплифицируется с помощью полиении. Даже в этом случае отсутствует селективная амплификация генов фиброина. На основании этого мы полагаем, что определенные гены могут транскрибироваться избирательно.



Рис. 11.15. Амплификация генов хориона в фолликулярных клетках *Drosophila* (электронная микрофотография). Стрелками указаны места репликации ДНК. (Из Osheim, Miller, 1983; фотография с любезного разрешения O. L. Miller, Jr.)

Хромосомные пuffs и хромосомы типа ламповых щеток

Природа политенных хромосом и их пuffs была рассмотрена в гл. 10. Представленные в ней данные иллюстрируют контроль за активностью определенных генов на уровне транскрипции. Если к слюнным железам добавляют экдистерон, то наблюдается возникновение одних пuffs и исчезновение других. Образование пuffs опосредовано присоединением экдистерона к специфическим участкам на хромосомах. Это может быть продемонстрировано путем «сшивания» экдистерона с хроматином, которое фиксирует его положение на местах связывания.

Затем добавляют кроличьи антитела против экдистерона и несвязавшиеся антитела удаляют промывкой. В конце добавляют меченные флуоресцентным козы антигена, полученные против иммуноглобулинов кролика, и несвязавшиеся антитела отмывают. В результате флуоресцентная метка должна обнаруживаться в тех местах, где козы антигена связались кроличьими антителами, а кроличьи антитела должны присоединяться только к экдистерону. Таким образом, флуоресцентная метка должна появиться на хромосоме в каждом сайте, где был связан экдистерон (Gronemeyer, Pongs, 1980). Результаты свидетельствуют о том (рис. 11.16), что практически все экдистерон-чувствительные пuffs связывают экдистерон.

Экдистерон-чувствительные пuffs, обнаруживаемые у поздней личинки третьего возраста (когда она готовится стать куколкой), можно грубо разделить на три категории. Пuffs, которые исчезают в присутствии экдистерона; пuffs, которые быстро индуцируются экдистероном, и пuffs, которые появляются через несколько часов после стимуляции экдистероном. Ранние пuffs формируются в пределах 1 ч после добавления экдистерона. Кроме

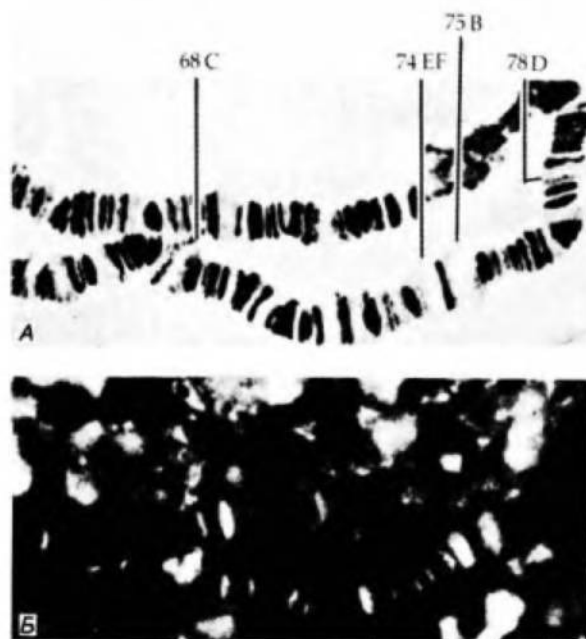


Рис. 11.16. Локализация экдистерона на политенных хромосомах *Drosophila*. После присоединения экдистерона к хромосомам *in situ* он может быть выявлен с помощью флуоресцирующих антител. А. Фрагмент хромосом слюнных желез (микрофотография методом фазового контраста). Б. Тот же фрагмент в ультрафиолетовом свете. Видна иммунофлуоресценция в областях, чувствительных к экдистерону. (С любезного разрешения O. Pongs.)

того, они, по-видимому, синтезируют продукты, которые необходимы для индукции поздних пухов. Если к культивируемым клеткам дрозофилы добавить ингибиторы синтеза белка вскоре после того, как образовались ранние пухы, то экдистерон не будет стимулировать формирование поздних пухов. Очевидно, таким образом, что для образования поздних пухов требуются и экдистерон, и продукты ранних пухов (Ashburner, 1974).

Важно отметить, что экдистерон не только стимулирует образование пухов в определенных участках хромосом личинки, но вызывает также регрессию некоторых уже существующих пухов. Один из таких пухов находится в положении 68С на левом плече хромосомы III. Этот сайт содержит ген для Sgs 3, «белка клея», обеспечивающего прикрепление оболочки куколки к твердой поверхности (Korge, 1975). У личинок последнего возраста этот участок хромосомы образует пух только в слюнных железах. Добавление экдистерона к культивируемым слюнным железам вызывает быструю регрессию этого пуха и прекращение транскрипции с данного гена (Crowley, Meyerowitz, 1984). Таким образом, белок клея может синтезироваться, когда он нужен для прикрепления личинки к субстрату, но после этого ген выключается и происходит метаморфоз.

Как будет рассмотрено более подробно в следующей главе, транскрипционная активность связана с изменениями в хроматине, и эти изменения могут быть вызваны присоединением негистоновых белков хроматина. Переваривание хроматина дрозофилы ДНКазой I приводит к высвобождению белка с молекулярной массой 63 000, который связывается со всеми экдизон-чувствительными локусами личинки третьего возраста (рис. 11.17). Хотя этот белок по своим размерам больше, чем белки, предположительно отвечающие за активацию транскрипции генов у позвоночных, он может выполнять аналогичную функцию в установлении и поддержании структуры хроматина, необходимой для активности генов (Mayfield et al., 1978).

Пухы представляют собой расплетенную ДНК в определенных областях хромосом личинок насекомых. Так как эти хромосомы политенные, характерный вид пуха создается тысячами нитей. Аналогичное расплетение ДНК в случае неполитенных хромосом наблюдается в ооцитах амфибий. Соответствующие структуры называют **хромосомами типа ламповых щеток**. На стадии диплотены мейоза компактные хромосомы амфибий образуют большие петли ДНК и втягивают их обратно после завершения этой стадии (рис. 11.18).

Представление о том, что подобное расплетение хромосом позволяет экспрессироваться определенным генам, может быть подтверждено с помощью гибридизации *in situ*. Для этого следует приготовить

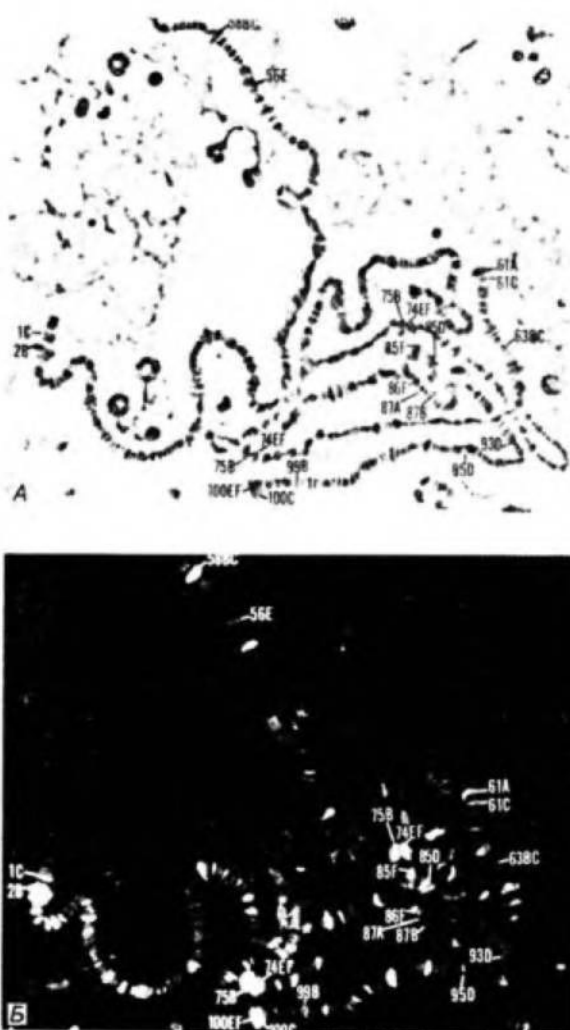


Рис. 11.17. Локализация белка, высвобождающегося из хроматина *Drosophila* при гидролизе ДНКазой I, с помощью иммунофлуоресценции. После получения антител к этому белку и их связывания с политенными хромосомами антитела могут быть выявлены с помощью других, флуоресцирующих антител. А. Микрофотография, полученная методом фазового контраста. Б. Тот же участок в ультрафиолетовом свете. Видны меченые сайты, чувствительные к экдистерону. (Рис. 11.16 и 11.17 можно сопоставить с рис. 10.26, на котором показана обычная последовательность пухов.) (Из Mayfield et al., 1978; фотографии с любезного разрешения S. Elgin.)

препараты хромосом ооцитов, денатурировать их и проинкубировать с радиоактивной РНК, которая кодирует определенный белок. После того как несвязавшаяся РНК удалена отмывкой, радиоавтография позволяет точно определить местоположение гена. На рис. 11.19 показана хромосома I на стадии диплотены из ооцита тритона *Triturus cristatus* после инкубации с радиоактивной мРНК для



Рис. 11.18. Фрагменты хромосом типа «ламповых щеток» из ядра ооцита тритона. Можно видеть участки ДНК, образующие петли от центральной оси. (С любезного разрешения J. Gall.)

гистонов. Очевидно, что ген гистона (или набор гистоновых генов) локализован на одной из петель хромосомы типа ламповой щетки (Old et al., 1977). На электронной микрофотографии транскрипты генов на хромосомах типа ламповых щеток очень напоминают транскрипты на амплифицированных генах рибосомной РНК. Та же полярность «рождественской елки», но обычно (за исключением семейств, подобных гистоновым генам) на каждой петле имеется только одна транскрипционная единица (Hill, MacGregor, 1980).

Синтез овальбумина

Огромное яйцо курицы защищено многими дополнительными слоями, которые секретируются на его поверхность при прохождении яйца через яйцевод (рис. 11.20). Овулировавшее яйцо попадает в **воронку** левого яйцевода (правый яйцевод атрофируется у большинства птиц), где вскоре и происходит оплодотворение. Затем яйцо проходит в **магнум**, где секретируется овальбумин и другие полипептиды яичного белка, в **перешеек**, где оно одевается несколькими оболочками, и наконец, в **матку**, где добавляются вода, соли и скорлупа из углекислого кальция.

Основным продуктом клеток стенки магнума является овальбумин, и у кур-несушек овальбумин составляет более 50% белков клеток стенки. Продукция овальбумина зависит от присутствия полового гормона эстрогена. Эстроген проникает в клетку и захватывается белком-рецептором, который доставляет его в ядро. Комплекс эстроген-рецептор проходит через ядерную мембрану и свя-

зывается с хроматином, где стимулирует транскрипцию.

Зависимость синтеза овальбумина от присутствия эстрогена наглядно показана в опыте, когда эстроген был инъецирован молодым курам (Palmi-



Рис. 11.19. Локализация гистоновых генов на хромосоме типа «ламповой щетки». Гены были визуализированы с помощью гибридизации in situ и радиоавтографии. (Из Old et al., 1977; с любезного разрешения H. G. Callan.)

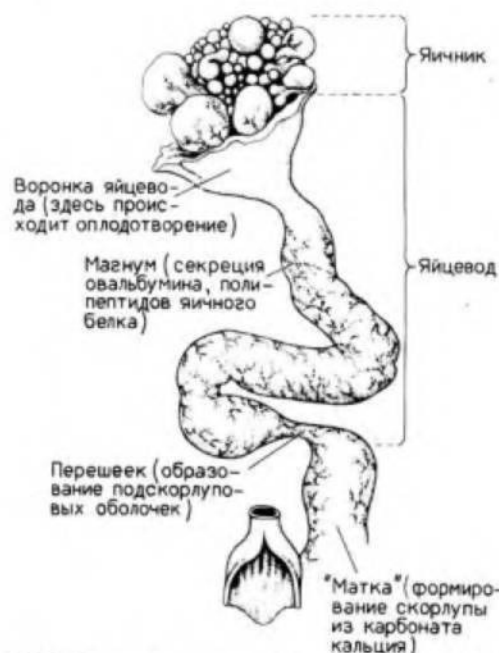


Рис. 11.20. Репродуктивная система половозрелой курицы. При прохождении яйца по яйцеводу оно покрывается многочисленными оболочками.

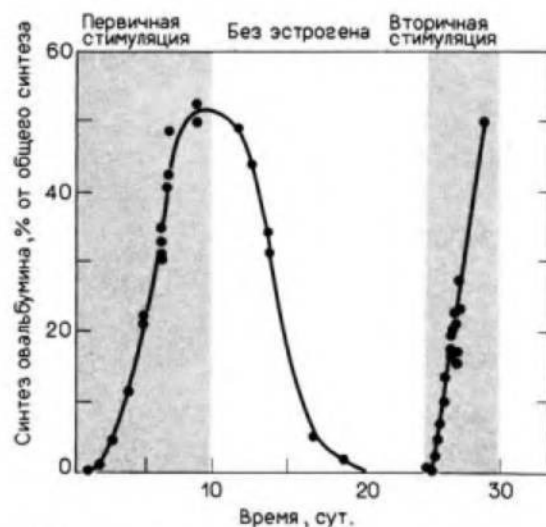


Рис. 11.21. Влияние эстрогена на синтез овальбумина в яйцевод 4-дневных цыплят. Цыплятам ежедневно инъектировали эстроген (первичная стимуляция); через 10 сут инъекции прекращали. Еще через две недели инъекции возобновляли (вторичная стимуляция). (По Palmiter, Schimke, 1973.)

ter, Schimke, 1973). Эти инъекции вызывают дифференцировку пристеночных желез магнума и индуцируют синтез основных полипептидов яичного белка: овальбумина, кональбумина, овомукоида и лизоцима. За 2 нед обработки эстрогеном уровень овальбумина поднимается с исчезающе малых количеств до более чем 50% всех новосинтезированных клеточных белков (рис. 11.21). Удаление эстрогена вызывает снижение синтеза овальбумина, несмотря на то что клетки сохраняют свое дифференцированное состояние. Через две недели после удаления эстрогена зарегистрировать наличие овальбумина не удавалось.

Этот опыт показывает только то, что синтез овальбумина зависит от присутствия гормона. Он не говорит нам о том, какова рабочая концентрация этого гормона. Можно представить, что гормон или усиливает транскрипцию, или стабилизирует полипептид овальбумина или его мРНК, или даже способствует транспорту овальбуминовой мРНК через

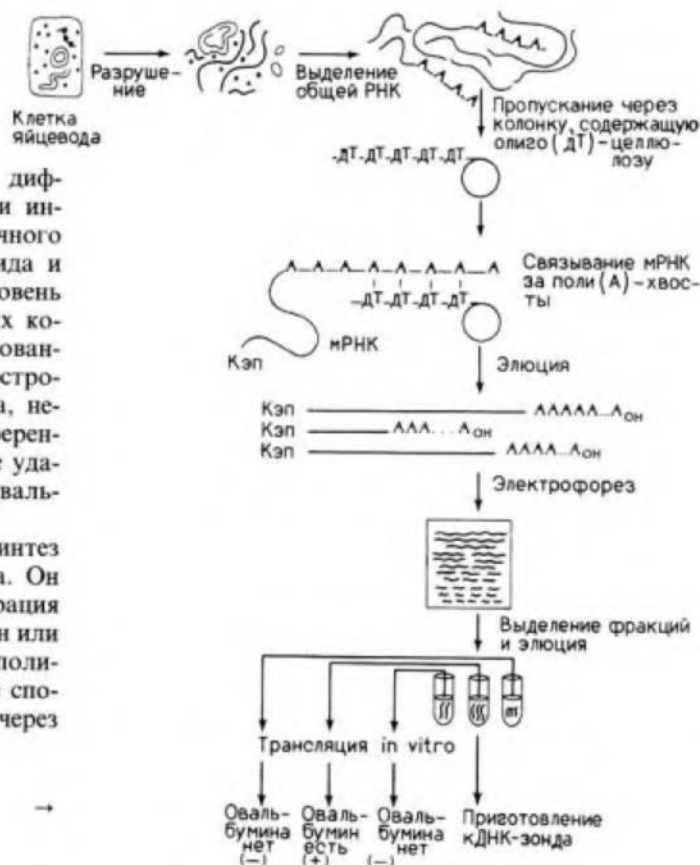


Рис. 11.22. Схема выделения овальбуминовой мРНК для приготовления кДНК-зонда. (Подробности см. в тексте.)

Таблица 11.2. Транскрипционная регуляция овальбумина

А. Индукция цитоплазматической овальбуминовой мРНК в ходе первичной и вторичной стимуляции эстрогеном		Б. Индукция ядерных РНК-транскриптов, содержащих последовательности овальбумина	
Уровень гормона в яйцевоме ¹⁾	Количество молекул мРНК на 1 клетку из желез стенки ²⁾	Ткань	Количество молекул РНК, содержащих последовательности овальбумина, на 1 ядро клетки из желез стенки ³⁾
Без стимуляции	Не регистрируется	Яйцевод, стимулированный эстрогеном	3075
+4 сут ДЭС	20 000		
+9 сут ДЭС	44 000		
+18 сут ДЭС	48 000		
После первичной стимуляции инкубация в течение 12 сут без эстрогена	0-4	Яйцевод после первичной стимуляции и инкубации без эстрогена	2
+0,5 ч ДЭС	9	+2 ч ДЭС	6
+1,0 ч ДЭС	50	+4 ч ДЭС	71
+4,0 ч ДЭС	2300	+8 ч ДЭС	460
+8,0 ч ДЭС	5100	+16 ч ДЭС	995
+29,0 ч ДЭС	17 000	+48 ч ДЭС	3049

А - из Harris et al., 1975.

Б - из Roop et al., 1978.

¹⁾ 10-дневные цыплята породы Белый Легорн получали ежедневно подкожные инъекции диэтилстильбэстрола (ДЭС - синтетический эстроген; 2,5 мг в масле); через определенные промежутки времени, указанные в таблице, цыплят забивали. В экспериментах по вторичной стимуляции эстрогеном цыплятам сначала вводили ДЭС в течение 10 сут и затем инкубировали их без дачи гормона в течение 11 сут. На 12 сут после прекращения дачи гормона цыплятам делали одноразовую подкожную инъекцию ДЭС в количестве 2,5 мг и через определенные, указанные в таблице промежутки времени у них удаляли яйцеводы.

²⁾ К овальбуминовой мРНК была получена радиоактивная ³²Н-кДНК, которую гибридизовали с общей РНК из яйцеводов цыплят, подвергнутых процедуре, описанной выше. Подсчитывали число молекул овальбуминовой мРНК.

³⁾ Определено с помощью гибридизации с кДНК_{ов}.

ядерную мембрану. На следующем этапе следовало найти корреляцию между уровнем эстрогена и присутствием овальбуминовой мРНК (Harris et al., 1975; McKnight, Palmiter, 1979). Чтобы осуществить это, на изолированной овальбуминовой мРНК была получена комплементарная ДНК. Овальбуминовую мРНК получали, пропуская цитоплазматическую мРНК из клеток яйцевода через колонку, содержащую гранулы олиго(дТ)-целлюлозы (рис. 11.22). Эти гранулы связывают мРНК, поскольку цепи из дезоксирибонуклеотида на гранулах присоединяют поли-(А)-хвосты молекул мРНК. Все другие нуклеиновые кислоты проходят через колонку свободно. Связавшуюся мРНК затем удаляли с колонки и разделяли на фракции с помощью электрофореза. Овальбуминовую мРНК можно легко выделить (так как она преобладает среди мРНК клетки) и затем транскрибировать *in vitro* для подтверждения того, что она кодирует овальбумин. Далее овальбуминовую мРНК использовали как матрицу для обратной транскриптазы и получали кДНК-зонд. Этот зонд позволяет «выловить» любую комплементарную последовательность и может зарегистрировать еди-

ничную копию гена овальбумина. Данные табл. 11.2, А показывают, что обработка эстрогеном индуцирует образование овальбуминовой мРНК. Не менее важны другие опыты с использованием кДНК-зонда, в которых было показано, что эстроген стимулирует появление последовательностей, кодирующих овальбумин, в ядре (Roop et al., 1978; табл. 11.2, Б). Таким образом, синтез овальбумина в клетках стенки магнума регулируется в первую очередь на уровне транскрипции гена.

Транскрипция глобиновых генов

Одним из хорошо документированных случаев регуляции дифференцировки на уровне транскрипции является активация глобинового гена в дифференцирующихся эритроцитах. У куриных зародышей и зародышей человека в процессе развития наблюдаются изменения в синтезе гемоглобина. На примере куриных эритробластов можно проследить за наиболее ранней транскрипцией гемоглобина. В выделенной из куриного зародыша в возрасте от 20 до 23 ч задней части темного поля наблюдаются

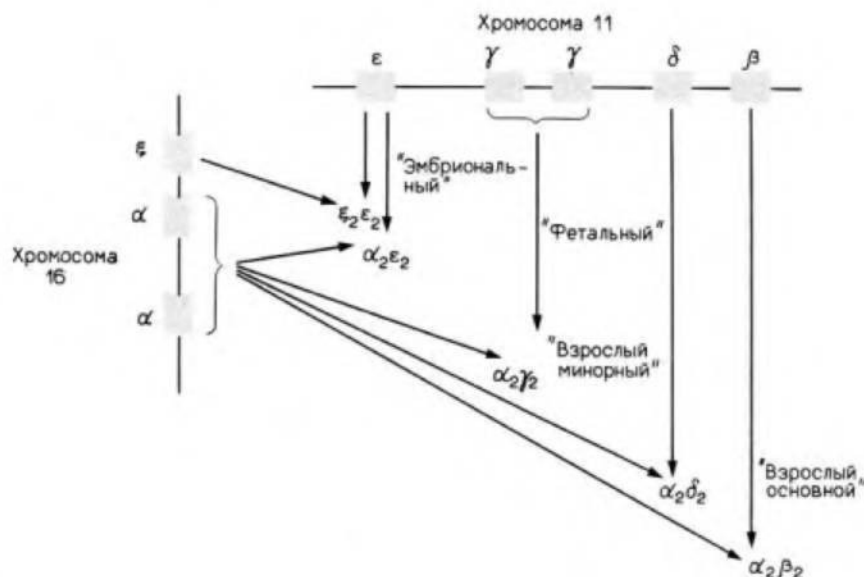


Рис. 11.23. Последовательная активация генов при синтезе гемоглобина в ходе развития.

кровенные островки, содержащие предшественники эритроцитов. Зонды комплементарной ДНК к глобиновым мРНК показывают, что эти клетки-предшественники еще не транскрибируют глобиновые гены. Однако после двух последующих клеточных делений (35 ч развития) клетки (теперь называемые эритроблестами) активно синтезируют гемоглобин. В течение этого периода происходит включение глобиновых генов; каким образом включаются эти гены, остается, правда, пока неясным.

Другой тип регуляции на уровне транскрипции осуществляется на более поздних стадиях развития. У многих видов, включая курицу и человека, эмбриональный и фетальный гемоглобины отличаются от гемоглобина взрослых особей. Схематическая диаграмма типов гемоглобинов человека и генов, которые их кодируют, показана на рис. 11.23.

Эмбриональный гемоглобин человека состоит в основном из двух дзета(ζ)-цепей глобина, двух эпсилон(ε)-цепей и четырех молекул гема. В течение второго месяца беременности синтез ζ- и ε-цепей внезапно прекращается, тогда как синтез альфа(α)- и гамма(γ)-цепей глобина усиливается (рис. 11.24). Объединение двух γ-цепей с двумя α-цепями образует **фетальный гемоглобин**. На третьем месяце беременности активируются гены бета(β)- и дельта(δ)-цепей глобина, концентрация этих продуктов медленно возрастает, тогда как концентрация γ-цепей постепенно снижается. Это переключение существенно ускоряется после рождения, и фетальный гемоглобин заменяется на гемоглобин взрослых, $\alpha_2\beta_2$. Гемоглобин взрослых людей в норме состоит на 97% из $\alpha_2\beta_2$, на 2–3% из $\alpha_2\delta_2$ и на 1% из $\alpha_2\gamma_2$.

У человека гены ζ- и α-цепей глобина расположе-

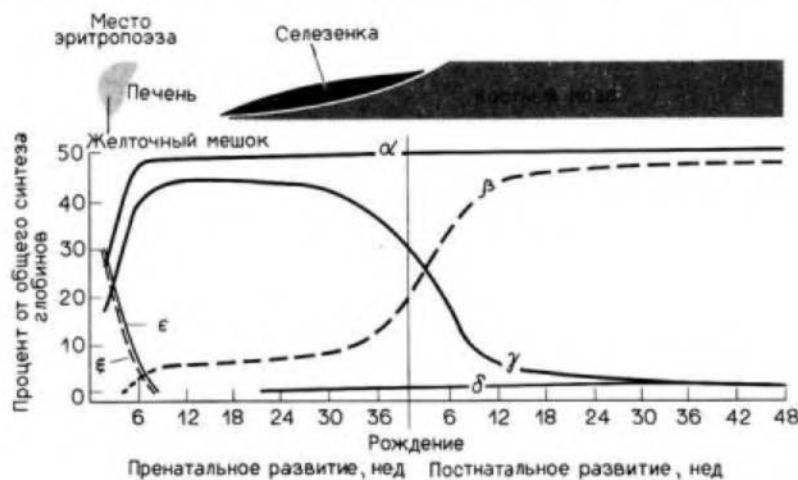


Рис. 11.24. Состав полипептидных цепей в гемоглобине человека (в процентах) в ходе индивидуального развития. Физиологическая роль γ-глобиновой цепи в фетальном гемоглобине объясняется в гл. 6. (По Karlsson, Nienhaus, 1985.)

ны в хромосоме 16, а гены ϵ -, γ -, δ - и β -цепей сцеплены вместе в соответствии с порядком их активации на хромосоме 11. Таким образом, представляется вероятным, что существует некий механизм, управляющий последовательным переключением генов на хромосоме 11 от генов эмбриональных глобинов к фетальным и, далее, к взрослым. Этот механизм до сих пор неизвестен, но один подход к его выявлению описан. У некоторых людей, хотя и совершенно здоровых, синтез фетального гемоглобина не выключается. В таких случаях у взрослых гены γ -цепей глобина продолжают оставаться активными, а гены β -цепей все еще не включены. В некоторых работах авторы высказывают предположение (см. Jagadeeswaran et al., 1982), что в переключении генов участвуют нуклеотиды, лежащие между генами γ - и δ -цепей глобина.

Другой недавно описанный подход связан с тем, что переключение от фетальных глобинов к взрослым глобинам происходит в одной линии клеток. Предшественники клеток крови, изолированные из желточных мешков эмбрионов человека, образуют эритроциты, содержащие цепи эмбрионального гемоглобина, а также последующие стволовые клетки. Потомство этих стволовых клеток дает начало эритроцитам, содержащим цепи фетальных, а позже взрослых глобинов (Stamatoyannopoulos et al., 1987). Это было показано также с помощью метода слияния клеток, когда фетальные эритроциты человека (предшественники эритроцитов, активно синтезирующие глобины) сливали с клетками эритробластов мыши. Вначале эти гибридные клетки синтезировали фетальный гемоглобин человека. Однако при последующих делениях в них начинали синтезироваться цепи взрослых глобинов. Эритроциты человека, полученные от плода в возрасте 15–20 нед, начинали этот переход быстрее, чем эритроциты от плода в возрасте 8–10 нед, что указывает на наличие в эритроцитах наследуемых «часов», которые регулируют переход от продукции фетальных глобинов к продукции взрослых глобинов (Papaioannopoulos et al., 1986).

Белок-регулятор транскрипции: контроль генов 5S-rРНК

Центральный промоторный элемент

На протяжении всего развития активность гена 5S-rРНК регулируется на уровне транскрипции. В гаплоидном геноме имеется 20 000 «ооцитных» 5S-генов и 400 «соматических» 5S-генов, и все они транскрибируются в течение раннего оогенеза. В позднем оогенезе все 5S-гены выключены вплоть до перехода к средней бластуле. На стадии средней бластулы экспрессируются и ооцитные, и сомати-

ческие 5S-гены, но к концу стадии бластулы активны только соматические 5S-гены.

РНК-полимераза III, контролирующая транскрипцию генов 5S-rРНК, имеет уникальный промотор. Если промоторы для РНК-полимераз I и II лежат в участках, фланкирующих гены с 5'-стороны (как у бактерий), то промоторы для РНК-полимеразы III находятся в центре гена. Это было показано с помощью введения делеций в различные области внутри и вокруг генов 5S-rРНК у *Xenopus* и последующего анализа уровня транскрипции полученных генов в смесях, содержащих рибонуклеотиды, РНК-полимеразу III и экстракты ядер. Правильная транскрипция продолжалась даже после ферментативного удаления 5'- и 3'-фланкирующих участков гена 5S-rРНК (рис. 11.25). Транскрипция прекращалась только тогда, когда удаляли нуклеотиды из положений от 50 до 83 (Sakonju et al., 1980; Bogenhagen et al., 1980). Кроме того, оказалось, что эти нуклеотиды образуют консервативный участок в генах, которые транскрибируются РНК-полимеразой III. Последовательность АГЦАГГГТ обнаружена в положении 55–62 в гене 5S-rРНК у *Xenopus*; похожие последовательности (с заменой не более двух пар оснований) обнаружены внутри гена тирозиновой тРНК у *Bombyx mori* (шелкопряд) и гена VA-I аденовирусов.

Регуляция транскрипции фактором TFIIIA

В отличие от РНК-полимеразы бактерий РНК-полимеразы из клеток эукариот не присоединяются непосредственно к ДНК. Их связывание с промотором опосредовано особыми белками. Если гены 5S-rРНК, выделенные из клеток *Xenopus laevis*, инкубировать с РНК-полимеразой III, то правильной транскрипции генов не происходит. Однако правильная транскрипция наблюдается в случаях, когда используется хроматин, содержащий ген 5S-rРНК, или гены 5S-rРНК инкубируют в ядерном экстракте. Имеется белок с молекулярной массой 38 500 дальтон, который связывается с контролирующей областью гена 5S-rРНК и регулирует присоединение РНК-полимеразы III (Ng et al., 1979; Engelke et al., 1980). В отсутствие этого белка ген 5S-rРНК не активен.

Этот белок, названный TFIIIA (т.е. первый транскрипционный фактор для РНК-полимеразы III), специфичен для гена 5S-rРНК (он не связывается с промоторами других генов, зависящих от РНК-полимеразы III), и его синтез регулируется в процессе развития. Он в огромном количестве присутствует в раннем оогенезе, когда синтезируется чрезвычайно много 5S-rРНК, но его концентрация падает до крайне низкого уровня в зрелых ооцитах (Ginsburg et al., 1984). Связь TFIIIA с внут-

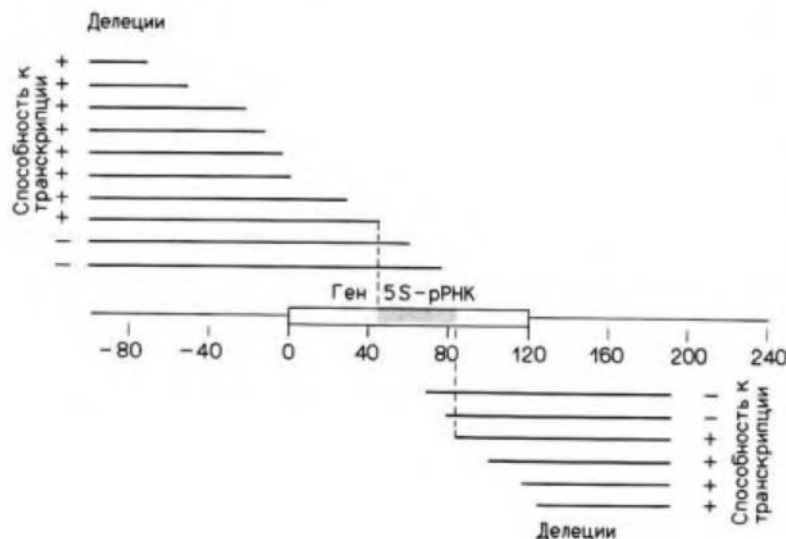
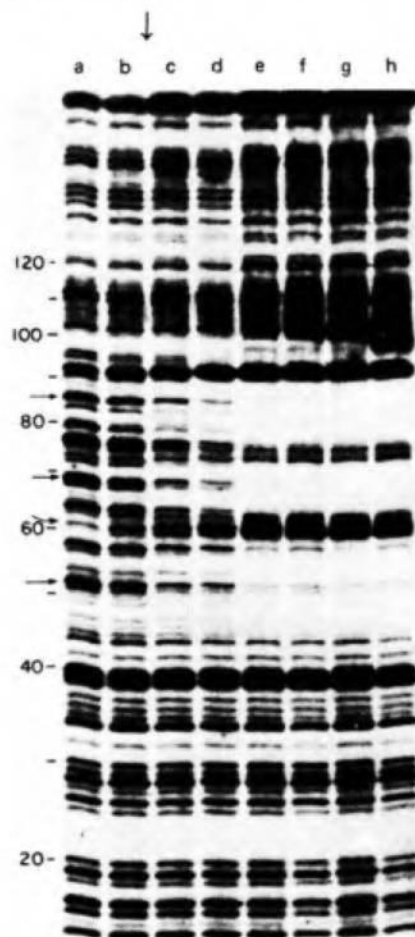


Рис. 11.25. Карта делеций в гене 5S-рРНК *Xenopus laevis*. Жирные горизонтальные линии показывают делетированные участки ДНК в плаزمидах, содержащих ген 5S-рРНК. Знаком плюс указаны те плазмиды, в которых оставшаяся ДНК поддерживает правильную транскрипцию 5S-рРНК. Знаком минус указана неспособность к правильной транскрипции. С помощью этих делеций идентифицирована контролирующая область внутри гена, которая имеет длину около 30 пар оснований. (По Brown, 1981.)

Рис. 11.26. Радиоавтограмма радиоактивной 5S-ДНК, которую инкубировали с возрастающими концентрациями ТФIIIA и затем гидролизовали ДНКазой I. Фрагменты, полученные после такой обработки, разделяли с помощью электрофореза и проводили радиоавтографию. Участки, где ДНК была защищена, выявляются как светлые полосы. (Из Sakonju, Brown, 1982; фотография с любезного разрешения D. D. Brown.)



ренним промотором генов 5S-рРНК дополнительно стабилизируется двумя неспецифическими факторами ТФIIIC и ТФIIIB (Lasser et al., 1983; Pieler et al., 1987). Транскрипция начинается после того, как к этому комплексу присоединяется РНК-полимераза III.

Кроме того, оказалось, что тип и количество 5S-рРНК зависят от концентрации ТФIIIA в ядре. Каким образом осуществляется этот контроль? Браун и Шлиссель (Brown, Schlissel, 1985) инъецировали клонированные ооцитные и соматические гены 5S-рРНК в ооциты и ядра клеток бластулы; оказалось, что ТФIIIA имеет существенно более высокое (более чем в 200 раз) сродство к контролирующей области соматических генов 5S-рРНК, чем к контролирующей области ооцитных генов. Это свойство означает, что при низких концентрациях фактора среди генов, связывающих ТФIIIA, практически все будут генами соматического типа, но при более высоких концентрациях фактора станут активироваться также и ооцитные гены 5S-рРНК. Инъекция очищенного ТФIIIA в зародыши на стадии поздней бластулы (где активны только соматические гены 5S-рРНК) приводила к активации также ооцитных 5S-генов.

Связывание и функция ТФIIIA

Сайты связывания ТФIIIA в гене 5S-рРНК были определены с помощью мутационного анализа, картирования (футпринтинга) ДНКазой I, метилирования гуанозинов и блокирования фосфатов (Sakonju, Brown, 1982; Pieler et al., 1985). По результатам мутационного анализа были установлены три

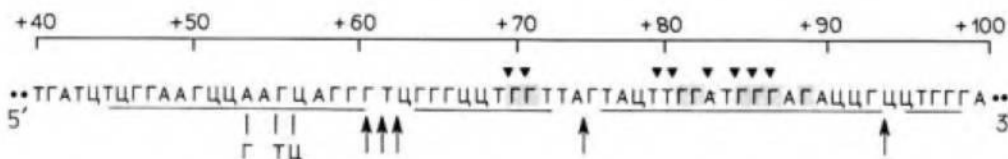


Рис. 11.27. Схема взаимодействия между TFIIIA и внутренней контролирующей областью соматического гена 5S-рРНК *Xenopus*. Гуанозиновые остатки, метилирование которых влияет на связывание TFIIIA, помещены в прямоугольники серого цвета. Фосфатные группы в ДНК, которые контактируют с TFIIIA, указаны черными треугольниками; последовательности ДНК, защищенные белком TFIIIA от гидролиза ДНКазой I, подчеркнуты. Основания, которые отличаются в ооцитном гене 5S-рРНК, приведены под цепью ДНК. (По Sakonju, Brown, 1982.)

участка, необходимые для правильной транскрипции: нуклеотиды в положениях 50–61, 70–71 и 80–89. Последовательность нуклеотидов 50–61 обнаружена во всех других генах, транскрибируемых РНК-полимеразой III. В этом консервативном участке соматический 5S-ген отличается от ооцитного 5S-гена, и это различие, как полагают, обеспечивает разное сродство этих двух генов к TFIIIA. «Футпринтинг» ДНКазой I осуществляется путем присоединения белка (в данном случае TFIIIA) к радиоактивной ДНК и последующего переваривания ДНК с помощью этой относительно неспецифической ДНКазы. Полученную ДНК вносят в гель и разделяют электрофорезом, как при секвенировании. При этом получают ожидаемую олигонуклеотидную «лестницу», характерную для секвенирующих гелей, где каждый олигонуклеотид на одно основание короче, чем олигонуклеотид, лежащий выше его. Однако в тех участках, где ДНК защищена белком от гидролиза ДНКазой, соответствующие олигонуклеотиды отсутствуют. Результат такого опыта в случае связывания TFIIIA с геном 5S-рРНК из ооцита *Xenopus* представлен на рис. 11.26. Отчетливо видны три сайта связывания.

Можно выяснить, меняется ли данный характер защиты нуклеотидов в ДНК при модификации

остатков гуанозина (метилированием) или фосфатных групп (этилированием). Метилирование определенных групп гуанозинов (70 и 71; 80–89) и этилирование определенных групп фосфатов (70 и 71; 80–87) подавляет связывание TFIIIA и предотвращает защиту этим белком указанных участков ДНК. Эти данные суммированы на рис. 11.27; они выявляют три сайта связывания TFIIIA на гене 5S-рРНК.

Если в 5S-промоторе присутствуют три основных участка связывания TFIIIA, то в белке TFIIIA имеются девять доменов, связывающих ДНК. Каждый из этих «ДНК-связывающих пальцев» представляет собой глобулярный домен, в центре которого находятся преимущественно основные аминокислоты. Эти домены соединены друг с другом тандемно, и каждый стабилизирован ионом цинка, расположенным в центре домена (рис. 11.28). Предполагается, что такое строение позволяет TFIIIA удерживаться на гене при движении по нему РНК-полимеразы (Miller et al., 1985). Если один из связывающих доменов открепляется, то прикрепление к ДНК будут обеспечивать другие домены.

Какая из функций TFIIIA делает его необходимым для транскрипции? Группой исследователей (Kmiec, Worcel, 1985; Kmiec et al., 1986) было высказано предположение, что роль TFIIIA заключается

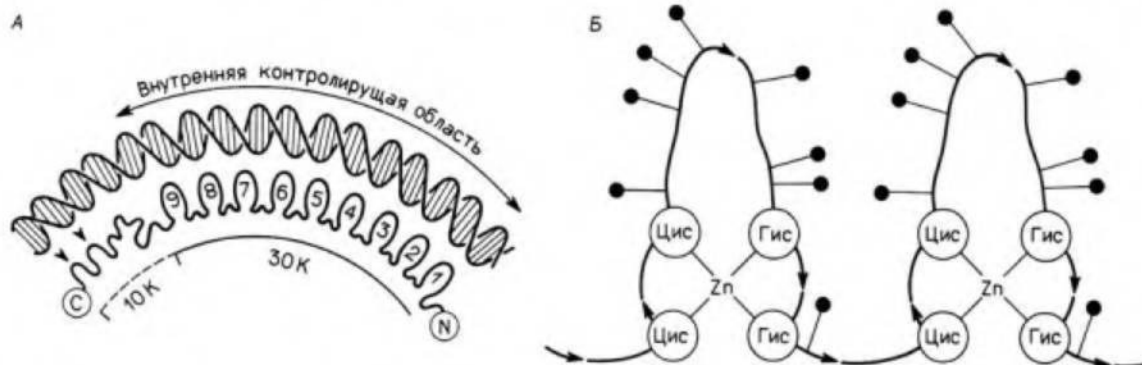


Рис. 11.28. Сопоставление структур белка-регулятора транскрипции TFIIIA и внутренней контролирующей области молекулы ДНК. А. Ориентация белка по отношению к ДНК. Девять «пальцев», связывающихся с 5S-промотором, экспонированы. Б. Детальный вид ДНК-связывающих «пальцев», стабилизированных цинком; основные остатки (черные кружки) присоединяются к ДНК. (По Miller et al., 1985.)

в индукции изгибов ДНК, вызывающих расхождение двух нитей спирали. Белок TFIIIA вызывает, по-видимому, изменение конформации гена 5S-rРНК, когда их добавляют друг к другу в присутствии ядерного экстракта. Хотя эти данные противоречивы (Wolffe et al., 1987), они привлекают внимание к интересному направлению в исследованиях регуляции транскрипции генов 5S-РНК.

Контроль детерминации на уровне транскрипции: гены переключения путей дифференцировки дочерних клеток

До сих пор при обсуждении контроля на уровне транскрипции мы рассматривали те гены, продукты которых являются следствием дифференцировки, а не их причиной. Синтез глобинов, например, не является последней стадией в дифференцировке эритроцитов. Существуют ли случаи, когда транскрипция способна заставить клетку стать клеткой крови вместо того, чтобы стать клеткой кости? Могут ли гены, активные на ранних этапах развития, определять судьбу клетки? В 1940 г. Уолдингтон, один из наиболее прозорливых теоретиков биологии развития, предсказал существование «генов-переключателей». Эти гены, по его словам, могут работать как стрелки на сортировочной станции, которые определяют, по какому пути следовать поезду (рис. 11.29). Такие гены могли бы обеспечивать тем или иным способом активацию батареи генов для какого-то одного пути развития, а не для другого, альтернативного.

Недавно была открыта группа генов, которые имеют свойства таких «генов-переключателей». Клетки, в которых экспрессируются гены-переключатели, имеют возможность дать потомство одного

из двух клеточных типов, и наличие или отсутствие продуктов этого гена определяет, какое потомство будут генерировать эти клетки.

Локус *lin-12* у круглого червя *Caenorhabditis elegans* контролирует два альтернативных клеточных типа (Greenwald et al., 1983). У зародышей дикого типа имеются две соседние клетки, Z1.ppp и Z4.aaa, которые взаимодействуют друг с другом (Kimble, 1981). Любая из этих клеток может дать начало якорной клетке матки (*ac*), тогда как другая клетка будет формировать предшественник брюшной клетки матки (*vu*). У мутантов, рецессивных по локусу *lin-12*, соответствующий ген не транскрибируется. Обе клетки становятся якорными клетками. У мутантов, доминантных по этому локусу, у которых уровень транскрипции *lin-12* очень высок, обе клетки становятся предшественниками брюшных клеток матки (табл. 11.3). Ген *lin-12* контролирует, по-видимому, бинарное переключение с одного альтернативного пути развития на другой. Один из наиболее интересных аспектов функционирования гена *lin-12* заключается в том, что он определяет один из двух путей развития для нескольких клеток в различных частях тела. Как указано в таблице, брюшные и спинные *m(1/r)*-клетки становятся соответственно половыми мезобластами и целомоцитами. В случае если в клетках произошла доминантная мутация по гену *lin-12*, обе клетки становятся половыми мезобластами; если же мутация оказывается рецессивной, то обе клетки становятся целомоцитами.

Мутация *Notch* у дрозофилы также направляет бипотенциальную клетку по одному из двух альтернативных путей. В этом случае происходит выбор между клеткой кожи (гиподермы) или нейробластом. Вскоре после гаструляции зона приблизительно из 1800 эктодермальных клеток располагается по средней линии вдоль вентральной стороны зародыша дрозофилы. Эти клетки формируют брюш-



Рис. 11.29. Фотография сортировочной станции, сделанная Джозефом Нидхэмом (J. Needham, 1936) для иллюстрации гипотезы своего друга и коллеги Ч. Уолдингтона. Рельсы символизируют различные пути развития, по которым могут следовать вагоны. Хорошо видны разветвления путей.

Таблица 11.3. Детерминация клеток у мутантов по гену *lin-12*

Мутант	Клетки			
	Z1.ppp	Z4.aaa	M.v. (l/r)pa	M.d. (l/r)pa
<i>lin-12(+)</i>	Предшественник брюшной клетки матки или якорная клетка	Предшественник брюшной клетки матки или якорная клетка	Половой мезобласт	Целомоцит
<i>lin-12(0)</i>	Якорная клетка	Якорная клетка	Целомоцит	Целомоцит
<i>lin-12(d)</i>	Предшественник брюшной клетки матки	Предшественник брюшной клетки матки	Половой мезобласт	Половой мезобласт

Greenwald, 1987.

ную нервную цепочку насекомого, и примерно четверть из них становятся нейробластами, тогда как оставшиеся становятся предшественниками клеток гиподермы. Клетки, которые дают начало нейробластам, перемешаны с теми клетками, которым предопределено дать начало гиподермальным предшественникам. Таким образом, у зародыша дрозофилы каждая клетка эктодермы в области формирования нервной цепочки может дать начало предшественникам либо гиподермальным, либо нервных клеток (Hartenstein, Campos-Ortega, 1984). В отсутствие транскрипции гена *Notch* у зародыша клетки развиваются в предшественников нервных клеток, а не в смесь предшественников гиподермальных и нервных клеток (рис. 11.30; Lehmann et al., 1983;

Artavanis-Tsakonis et al., 1983). Эти зародыши погибают из-за большого избытка нервных клеток и отсутствия брюшной и головной гиподермы (Poulson, 1937; Hoppe, Greenspan, 1986). Ген *Notch* был клонирован (Kidd et al., 1983; Yedvobnick et al., 1985), и было обнаружено, что он транскрибируется в течение первой половины эмбриогенеза (и позднее на стадии ранней куколки) (рис. 11.31).

Последовательности обоих генов – *Notch* и *lin-12* – в значительной степени гомологичны последовательности фактора роста эпидермиса (ФРЭ) – важного регулятора роста клеток млекопитающих (гл. 20). N-концевая половина белкового продукта гена *Notch* содержит 36 tandemных копий ФРЭ-подобных пептидных последовательностей, каждая

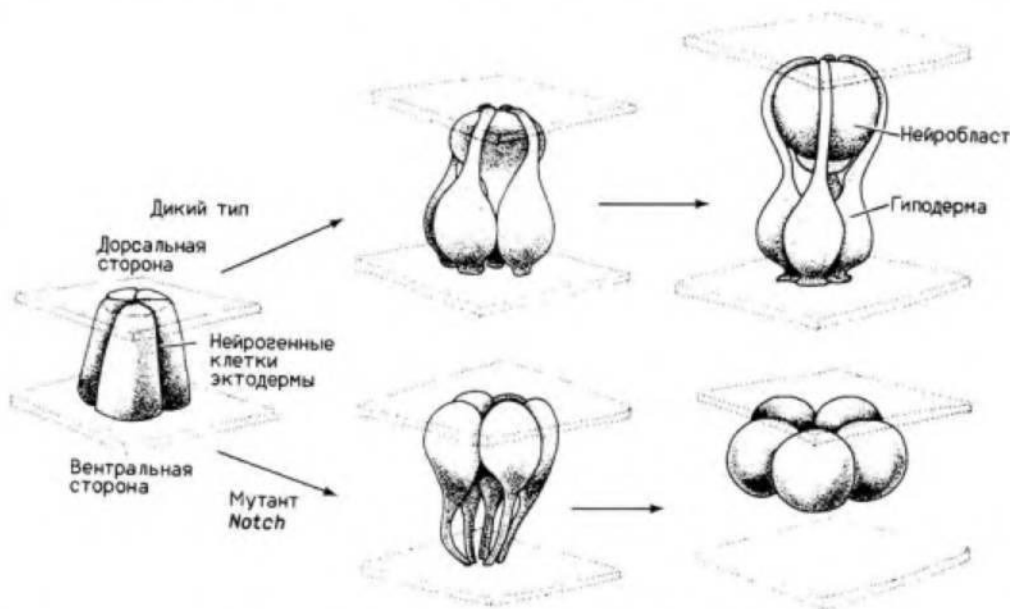


Рис. 11.30. Иллюстрация проявления мутации *Notch*. У зародышей дикого типа нейрогенные клетки эктодермы дают начало как нейробластам, так и клеткам кожи (гиподерме). У зародышей *Notch* все клетки нейрогенной эктодермы развиваются в нейробласты.

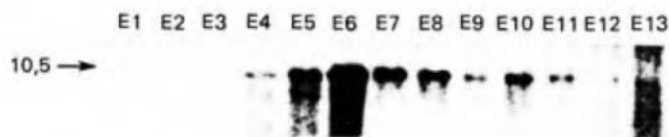


Рис. 11.31. Нозерн-блот транскрипции гена *Notch* дикого типа на различных стадиях развития *Drosophila*. Числами указаны часы развития при 25°С. Максимальная транскрипция приходится на 6–7 ч после откладки яиц. (Из Yedvobnick et al., 1985; фотография с любезного разрешения S. Artavanis-Tsakonas.)

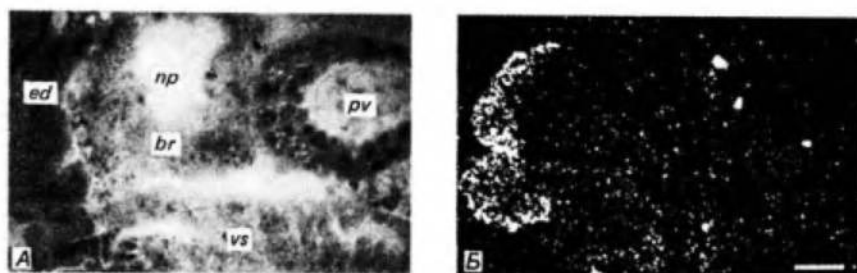


Рис. 11.32. Гибридизация in situ, показывающая локализацию мРНК гена *sevenless* дикого типа. Срезы для микроскопии инкубировали с радиоактивным рестрикционным фрагментом гена *sevenless* дикого типа и затем проводили радиоавтографию. А. Окрашенный срез, на котором видны области мозга личинки (*br*, *pv*, *vs*) и глазного диска (*ed*). Б. Меченая ДНК гибридизуется с мРНК только в той части имажинального диска личинки, которая станет сетчаткой взрослого организма. (Из Hafen et al., 1987; фотография с любезного разрешения E. Hafen.)

из которых, как полагают, выпячивается из клеточной мембраны (Wharton et al., 1985). Сходным образом продукт гена *lin-12* имеет по меньшей мере 11 ФРЭ-подобных повторов; полагают, что они также выступают за клеточную поверхность. Было высказано предположение, что многомерные ФРЭ-участки могут связывать клетки друг с другом и действовать как стимулятор митоза (Burgess, 1987). В случае мутантов *Notch*, у которых функция этого гена нарушена, такие агрегаты делящихся клеток не способны развиваться в клетки гиподермы, т.е. они будут предназначены для образования нейробластов.

Если гены-переключатели *lin-12* и *Notch* кодируют продукты, напоминающие связанные с мембраной факторы роста, то другой ген-переключатель — *sevenless* — кодирует белок, который похож на связанный с мембраной рецептор фактора роста. Этот ген активен в имажинальных дисках глаза у личинок последнего возраста дрозофилы (рис. 11.32). Он контролирует переключение, определяю-

щее, какая клетка возникнет из клетки сетчатки: седьмой фоторецептор (ультрафиолетчувствительная нервная клетка) или ненейральная колбочка. Надлежащая транскрипция гена *sevenless* необходима для коммитирования клетки к формированию этого нейрона, и в отсутствие полноценного функционирования гена *sevenless* все бипотенциальные клетки станут предшественниками колбочек (Banerjee et al., 1987; Hafen et al., 1987).

Три описанных гена контролируют переключение развития, при котором бипотенциальной клетке разрешается следовать по одному из двух альтернативных путей дифференцировки. Во всех трех случаях межклеточные взаимодействия играют, по-видимому, критическую роль. Структура каждого из белковых продуктов этих генов свидетельствует о том, что этот продукт связан с мембраной и способен взаимодействовать с поверхностями других клеток. На повестке дня — изучение механизмов, посредством которых такие взаимодействия контролируют судьбу клеток.

Дополнительные сведения и гипотезы

Детерминация клеток вульвы у *Caenorhabditis elegans*

В гл. 7 мы отметили, что *C. elegans* был введен как экспериментальный объект, на котором исследования по биологии развития и генетике могут проводиться на одной особи одновременно. Такая

программа начинает приносить плоды в изучении генетической регуляции детерминации клеток.

Как отмечено ранее, индукционный сигнал для развития вульвы возникает в якорных клетках

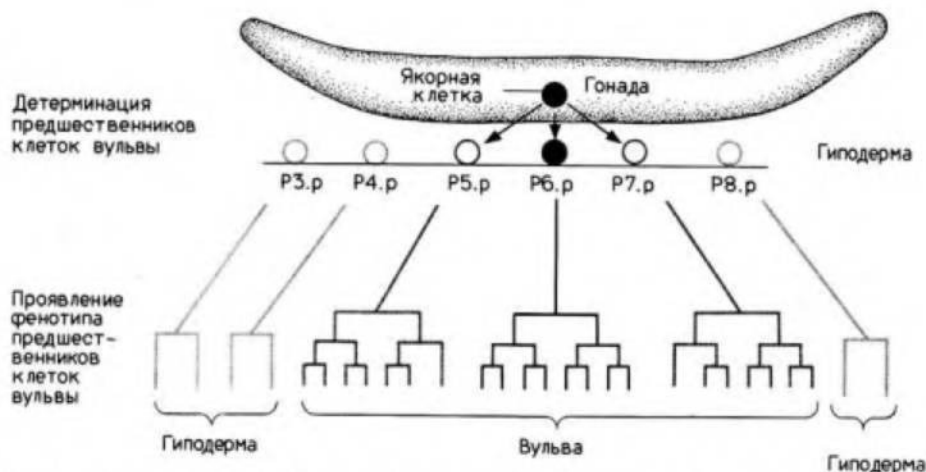


Рис. 11.33. Детерминация и проявление фенотипа в ряду клеток вульвы у нематоды *C. elegans*. Детерминация определяется близостью к якорной клетке, которая вызывает деление клетки P6.p с образованием восьми клеток вульвы, при этом клетки P5.p и P7.p продуцируют по семь клеток вульвы каждая. Три других потенциальных предшественника клеток вульвы не детерминируются к образованию вульвы, а формируют вместо этого гипобласт. Различные мутации могут изменить детерминацию этих клеток или проявление их детерминированного состояния. (По Ferguson et al., 1987.)

гонад. Этот сигнал (пока не идентифицирован, но полагают, что он представляет собой способную к диффузии молекулу) действует в зависимости от положения на шесть клеток (P(3-8).p), способных формировать ткань вульвы (рис. 11.33). Клетка, ближайшая к якорной клетке (обычно P6.p), стимулируется к трем симметричным циклам митоза для формирования клеток вульвы. Две клетки, лежащие по обе стороны от нее (P5.p и P7.p), подвергаются делению, незначительно отличающемуся от обычного; в результате также возникают клетки вульвы. Три других потенциальных предшественника не предназначаются для образования клеток вульвы; они делятся один раз и дают клетки, входящие в гиподерму нематоды.

Обнаружено более двух десятков мутаций, нарушающих развитие вульвы. С помощью конструирования двойных мутантов, у которых один зародыш несет две отдельные мутации, влияющие на развитие вульвы, можно определить, какие гены активны ранее других, и, следовательно, постулировать генетическую программу. Возможность наблюдать деление каждой клетки, входящей в вульву, позволяет указать точное место, где данная мутация проявляется впервые, и установить соответствие между генетической программой и развитием (Ferguson et al., 1987).

Первый набор генов в генетической программе и программе развития составляют те гены, которые контролируют образование предшественников клеток вульвы и якорной клетки. Как упоминалось ранее, ген *lin-12* контролирует формирование якорной клетки таким образом, что у мутантов, до-

минантных по гену *lin-12*, она не образуется (оба возможных предшественника якорной клетки становятся клетками матки). В отсутствие якорной клетки возможные предшественники клеток вульвы делятся, чтобы образовать клетки гиподермы.

Второй набор генов детерминирует дифференцировку предшественников клеток вульвы. У таких мутантов, как *lin-12*, все возможные предшественники клеток вульвы ведут себя подобно клеткам P3.p, P4.p и P8.p. Иными словами, они все дают начало клеткам гиподермы, и вульвы не образуется. Напротив, у мутантов, подобных *lin-15*, все шесть клеток-предшественников ведут себя как предшественник P6.p и формируют ткань вульвы. Эти мутанты имеют несколько вульв. Проявление этих мутаций детерминации не зависит от силы индукционного сигнала якорной клетки и определяется, очевидно, на уровне рецепции и ответа на этот сигнал. (До сих пор не обнаружены мутанты, у которых отсутствует сигнал якорных клеток, какой бы природы он ни был.)

Третий набор генов отвечает за проявление детерминированного фенотипа. Три гена, *lin-11*, *lin-17* и *lin-18*, контролируют, по-видимому, фенотип потомков клеток P5.p и P7.p, влияя на направление, в котором следует делиться этим клеткам-предшественникам. В этих случаях дочерние клетки напоминают потомков P6.p, а не потомков P5.p или P7.p. Такое изменение в характере деления может привести к распределению конкретных морфогенетических детерминантов по разным областям цитоплазмы.

РЕЗЮМЕ

Дифференциальная экспрессия генов может регулироваться на уровне транскрипции несколькими способами. Например, при гетерохроматизации значительные по размерам части хромосом могут стать генетически инертными; в случае глобиновых генов и генов овальбумина конкретный ген может быть активирован в клетке определенного типа и в определенное время. В некоторых случаях, когда требуются большие количества обычного продукта того или иного гена (как для рибосомных генов ооцитов амфибий), гены могут быть амплифицированы (для 40S-РНК) и могут синтезироваться позитивные транскрипционные факторы (TFIIIA для 5S-рРНК). Регуляция на уровне транскрипции может также определять судьбу клеток. Транскрипция таких «генов-переключателей путей дифференцировки дочерних клеток» играет существенную роль в детерминации клеток. В этой главе мы увидели, что определенные гены находятся под дифференциальным контролем на уровне транскрипции. Но как осуществляется эта регуляция? Молекулярные механизмы дифференциальной транскрипции генов будут рассмотрены в гл. 12.

ЛИТЕРАТУРА

- Artavanis-Tsakonis S., Muskavitch M. A. T., Yedvobnick Y. (1983). Molecular cloning of *Notch*, a locus affecting neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**, 1977–1981.
- Ashburner M. (1974). Sequential gene activation by ecdysone in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. II. Effects of inhibitors of protein synthesis. Dev. Biol. **39**, 141–157.
- Banerjee U., Renfranz P. J., Pollack J. A., Benzer S. (1987). Molecular characterization of *sevenless*, a gene involved in neuronal pattern formation in the *Drosophila* eye. Cell **49**, 281–291.
- Barr M. L., Bertram E. G. (1949). A morphological distinction between neurones of the male and female, and the behavior of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. Nature **163**, 676.
- Bogenhagen D. F., Sakonju S., Brown D. D. (1980). A control region in the center of the 5 S RNA gene directs specific initiation of transcription. II. The 3' border of the region. Cell **19**, 27–35.
- Brown D. D. (1981). Gene expression in eukaryotes. Science **211**, 667–674.
- Brown D. D., David I. B. (1968). Specific gene amplification in oocytes. Science **160**, 272–280.
- Brown D. D., Schlissel M. S. (1985). A positive transcription factor controls the differential expression of two 5 S RNA genes. Cell **42**, 759–767.
- Brown S. W., Nelson-Rees W. A. (1961). Radiation analysis of a lecanoid genetic system. Genetics **46**, 983–1007.
- Burgess A. W. (1987). Growth factors and their receptors: Specific roles in development. BioEssays **6**, 79–81.
- Centerwall W. R., Benirschke K. (1973). Male tortoiseshell and calico (T-C) cats. J. Hered. **64**, 272–287.
- Cooper D. W., Vandeberg J. L., Sharmen G. B., Poole W. E. (1971). Phosphoglycerate kinase polymorphism in kangaroos provides further evidence for paternal X inactivation. Nature New Biol. **230**, 155–157.
- Crowley T. E., Meyerowitz E. M. (1984). Steroid regulation of RNAs transcribed from the *Drosophila* 68C polytene chromosome puff. Dev. Biol. **102**, 110–124.
- Davidson R. G., Nitowsky H. M., Childs B. (1963). Demonstration of two populations of cells in the human female heterozygous for glucose-6-phosphate dehydrogenase variants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **50**, 481–485.
- Driesch H. (1894). Analytische Theorie der Organischen Entwicklung. Wm. Engelmann, Leipzig. Quoted in J. Oppenheimer (1967), Essays in the History of Embryology and Biology. MIT Press, Cambridge, Mass., p. 76.
- Engelke D. R., Ng S.-Y., Shastri B. S., Roeder R. G. (1980). Specific interaction of a purified transcription factor with an internal control region of 5 S RNA genes. Cell **19**, 717–728.
- Ferguson E. C., Sternberg P. W., Horvitz R. (1987). A genetic pathway for the specification of the vulval cell lineages of *Caenorhabditis elegans*. Nature **326**, 259–267.
- Gartler S. M., Liskay R. M., Grant N. (1973). Two functional X chromosomes in human fetal oocytes. Exp. Cell Res. **82**, 464–466.
- Gartler S. M., Riggs A. D. (1983). Mammalian X-chromosome inactivation. Annu. Rev. Genet. **17**, 155–190.
- Gartler S. M., Rivest M., Cole R. E. (1980). Cytological evidence for an inactive X chromosome in murine oögonia. Cytogenet. Cell Genet. **28**, 203–207.
- Ginsberg A. M., King D. O., Roeder R. G. (1984). Xenopus 5 S gene transcription factor, TFIIIA: Characterization of a cDNA clone and measurement of RNA levels throughout development. Cell **39**, 479–489.
- Greenwald I. S. (1987). The *lin-12* locus of *Caenorhabditis elegans*. BioEssays **6**, 70–73.
- Greenwald I. S., Sternberg P. W., Horvitz H. R. (1983). The *lin-12* locus specifies cell fates in *Caenorhabditis elegans*. Cell **34**, 435–444.
- Gronemeyer H., Pongs O. (1980). Localization of ecdysterone on polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**, 2108–2112.
- Grumm I., Bartsch I., Rosenbauer H. (1986). A transcription terminator located upstream of the mouse rDNA initiation site effects rRNA synthesis. Cell **47**, 901–911.
- Hafen E., Basler K., Edstroem J.-E., Rubin G. M. (1987). *Sevenless*, a cell-specific homeotic gene of *Drosophila*, encodes a putative transmembrane receptor with a tyrosin kinase domain. Science **236**, 55–63.
- Harris S. E., Rosen J. M., Meens A. R., O'Malley B. W. (1975). Use of specific probe for ovalbumin messenger RNA to quantitate estrogen-induced transcripts. Biochemistry **14**, 2072–2081.
- Hartenstein V., Campos-Ortega J. A. (1984). Early neurogenesis in wild-type *Drosophila melanogaster*. Wilhelm Roux Arch. Dev. Biol. **193**, 308–325.
- Henderson S., Sollner-Webb B. (1986). A transcriptional terminator is a novel element of the promoter of the mouse ribosomal RNA gene. Cell **47**, 891–900.
- Hill R. S., MacGregor H. C. (1980). The development of lampbrush chromosome-type transcription in the early diplotene oocytes of *Xenopus laevis*: An electron microscope analysis. J. Cell Sci. **44**, 87–101.
- Hoppe P. E., Greenspan R. J. (1986). Local function of the *Notch* gene for embryonic ectodermal pathway choice in *Drosophila*. Cell **46**, 773–783.
- Hourcade D., Dressler D., Wolfson J. (1973). The amplification of ribosomal RNA genes involves a rolling circle intermediate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **70**, 2926–2930.
- Jagadeeswaran P., Tuan D., Forget B. G., Weissman S. M. (1982). A gene deletion ending at the midpoint of a repetitive DNA

- sequence in one form of hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Nature* **296**, 469–470.
- Karlsson S., Nienhaus A. W. (1985). Developmental regulation of human globin genes. *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 1071–1108.
- Kidd S., Lockett T. J., Young M. W. (1983). The *Notch* locus of *Drosophila melanogaster*. *Cell* **34**, 421–433.
- Kimble J. (1981). Alterations in cell lineage following laser ablation of cells in the somatic gonad of *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **87**, 286–300.
- Kmieć E. B., Razvi F., Worcel A. (1986). The role of DNA-mediated transfer of TFIIIA in the concerted gyration and differential activation of the *Xenopus* 5 S RNA genes. *Cell* **45**, 209–218.
- Kmieć E. B., Worcel A. (1985). The positive transcription factor for the 5 S RNA gene induces a 5 S DNA-specific gyration in *Xenopus* oocyte extracts. *Cell* **41**, 945–953.
- Korge G. (1975). Chromosome puff activity and protein synthesis in larval salivary glands of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 4550–4554.
- Korn L. (1982). Transcription of *Xenopus* 5 S ribosomal RNA genes. *Nature* **295**, 101–105.
- Kratzer P. G., Chapman V. M. (1981). X-chromosome reactivation in oocytes of *Mus caroli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 3093–3097.
- Labhart P., Reeder R. H. (1986). Characterization of three sites of RNA 3' end formation in the *Xenopus* ribosomal gene spacer. *Cell* **45**, 431–443.
- Lasser A. B., Martin P. L., Roeder R. G. (1983). Transcription of class III genes: Formation of preinitiation complexes. *Science* **222**, 740–748.
- Lehmann R., Jimenez F., Dietrich U., Campos-Ortega J. A. (1983). On the phenotype and development of mutants of early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Wilhelm Roux Arch. Dev. Biol.* **192**, 62–74.
- Lewin B. (1980). *Gene Expression* 2, 2nd Ed. Wiley-Interscience, New York.
- Lillie F. R. (1927). The gene and the ontologic process. *Science* **66**, 361–368.
- Lyon M. F. (1961). Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* **190**, 372–373.
- Mayfield J. E., Serunian L. A., Silver L. M., Elgin S. C. R. (1978). A protein released by DNase I digestion of *Drosophila* nuclei is preferentially associated with puffs. *Cell* **14**, 539–544.
- McBurney M. W., Strutt B. J. (1980). Genetic activity of X chromosomes in pluripotent female teratocarcinoma cells and their differentiated progeny. *Cell* **21**, 357–364.
- McKnight G. S., Palmiter R. D. (1979). Transcriptional regulation of the ovalbumin and conalbumin genes by steroid hormones in chick oviduct. *J. Biol. Chem.* **254**, 9050–9058.
- McStay B., Reeder R. H. (1986). A termination site for *Xenopus* RNA polymerase I also acts as an element of an adjacent promoter. *Cell* **47**, 913–920.
- Migeon B. R. (1971). Studies of skin fibroblasts from ten families with HGPRT deficiency, with reference to X-chromosomal inactivation. *Am. J. Human Genet.* **23**, 199–209.
- Migeon B. R., Jelalian K. (1977). Evidence for two active X-chromosomes in germ cells of female before meiotic entry. *Nature* **269**, 242–243.
- Migeon B. R., Schmidt M., Axelman J., Cullen C. R. (1986). Complete reactivation of X chromosomes from human chorionic villi with a switch to early DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 2182–2186.
- Migeon B. R., Wolf S. F., Axelman J., Kaslow D. C., Schmidt M. (1985). Incomplete X chromosome dosage compensation in chorionic villi of human placenta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 3390–3394.
- Miller D. L., Jr., Beatty B. R. (1969). Visualization of nucleolar genes. *Science* **164**, 955–957.
- Miller J., McLachlan A. D., Klug A. (1985). Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* **4**, 1609–1614.
- Mohandas T., Sparkes R. S., Hellkuhl B., Brzeschik K. H., Shapiro L. J. (1980). Expression of an X-linked gene from an inactive human X chromosome in mouse-human hybrid cells; Further evidence for the non-inactivation of the steroid sulfatase locus in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 6759–6763.
- Monk M., Harper M. I. (1979). Sequential X chromosome inactivation coupled with cellular differentiation in early mouse embryos. *Nature* **281**, 311–313.
- Moore K. L. (1977). *The Developing Human*. Saunders, Philadelphia.
- Morgan T. H. (1934). *Embryology and Genetics*. Columbia University Press, New York, pp. 9–10.
- Moss T. (1983). A transcriptional function for the repetitive ribosomal spacer in *Xenopus laevis*. *Nature* **302**, 223–228.
- Needham J. (1936). *Order and Life*. Yale University Press, New Haven.
- Nesbitt M. N. (1974). Chimeras vs. X inactivation mosaics: Significance of differences in pigment distribution. *Dev. Biol.* **38**, 202–207.
- Ng S.-Y., Parker C. S., Roeder R. G. (1979). Transcription of cloned *Xenopus laevis* RNA polymerase III in reconstituted systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 136–140.
- Old R. W., Callan H. G., Gross K. W. (1977). Localization of histone gene transcripts in newt lampbrush chromosomes by *in situ* hybridization. *J. Cell Sci.* **27**, 57–80.
- Osheim Y. N., Miller O. L. (1983). Novel amplification and transcriptional activity of chorion genes in *Drosophila melanogaster* follicle cells. *Cell* **33**, 543–553.
- Palmiter R. D., Schimke R. T. (1973). Regulation of protein synthesis in chick oviduct. III. Mechanism of ovalbumin "superinduction" by actinomycin D. *J. Biol. Chem.* **248**, 1502–1512.
- Papayannopoulou T., Brice M., Stamatoyannopoulos G. (1986). Analysis of human hemoglobin switching in MEL × human fetal erythroid cell hybrids. *Cell* **46**, 469–476.
- Pieler T., Hamm J., Roeder R. G. (1987). The 5 S gene internal control region is composed of three distinct sequence elements, organized as two functional domains with variable spacing. *Cell* **48**, 91–100.
- Pieler T., Oei S.-L., Hamm J., Engelke U., Erdmann V. A. (1985). Functional domains of the *Xenopus laevis* 5 S gene promoter. *EMBO J.* **4**, 3751–3756.
- Poulson D. F. (1937). Chromosomal deficiencies and the embryonic development of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **23**, 133–137.
- Renfree M. B. (1982). Implantation and placentation. In: C. R. Austin and R. V. Short (eds.), *Embryonic and Fetal Development*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 26–69.
- Rochaix J. D., Bird A., Bakken A. (1974). Ribosomal RNA gene amplification by rolling circles. *J. Mol. Biol.* **87**, 473–488.
- Roop D. R., Nordstrom J. L., Tsai S. Y., Tsai M.-J., O'Malley B. W. (1978). Transcription of structural and intervening sequences in the ovalbumin gene and identification of potential ovalbumin mRNA precursors. *Cell* **15**, 671–685.
- Rutter W., Jr., Valenzuela P., Bell G. E., Holland M., Hager G. L., Degennaro L. J., Bishop R. J. (1976). The role of DNA-dependent RNA polymerase in transcriptional specificity. In: E. M. Bradbury and K. Lavehrian (eds.), *The Organization and Expression of the Eukaryotic Genome*. Academic, New York, pp. 279–293.
- Sakonju S., Bogenhagen D. F., Brown D. D. (1980). A control region in the center of the 5 S RNA gene directs specific initiation of transcription. I. The 5' border of the region. *Cell* **19**, 13–25.
- Sakonju S., Brown D. D. (1982). Contact points between a posi-

- tive transcription factor and the *Xenopus* 5 S RNA gene. *Cell* **31**, 395–405.
- Samollow P. B., Ford A. L., VandeBerg J. L. (1987). X-linked gene expression in the Virginia opossum: Differences between the paternally derived *Gpd* and *Pgk-A* loci. *Genetics* **115**, 185–195.
- Sharman G. B. (1971). Late DNA replication in the paternally derived X chromosome of female kangaroos. *Nature* **230**, 231–232.
- Spradling A. C. (1981). The organization and amplification of two chromosomal domains containing *Drosophila* chorion genes. *Cell* **27**, 193–201.
- Spradling A. C., Mahowald A. P. (1980). Amplification of genes for chorion proteins during oogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 1096–1100.
- Stamatoyannopoulos G., Constantoulakis P., Brice M., Kurauchi S., Papayannopoulou T. (1987). Coexpression of embryonic, fetal, and adult globins in erythroid cells of human embryos: Relevance to the cell-lineage models of globin switching. *Dev. Biol.* **123**, 191–197.
- Tagaki N. (1974). Differentiation of X chromosomes in early female mouse embryos. *Exp. Cell Res.* **86**, 127–135.
- Waddington C. H. (1940). *Organisers and Genes*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Watson J. D. (1976). *Molecular Biology of the Gene*, 3rd Ed. Benjamin Cummings, Menlo Park, California.
- Wellauer P. K., Dawid I. B., Brown D. D., Reeder R. H. (1976). The arrangement of length heterogeneity in repeating units of amplified and chromosomal ribosomal DNA from *Xenopus laevis*. *J. Mol. Biol.* **105**, 487–506.
- West J. D., Frels W. I., Chapman V. M., Papaioannou V. E. (1977). Preferential expression of the maternally derived X chromosome in the mouse yolk sac. *Cell* **12**, 873–882.
- Wharton K. A., Johansen K., Artavanis-Tsakonas S. (1985). Nucleotide sequence from the neurogenic locus *Notch* implies a gene product which shares homology with proteins containing EGF-like repeats. *Cell* **43**, 567–581.
- Witschi E. (1957). Sex chromatin and sex differentiation in human embryos. *Science* **126**, 1288–1290.
- Wolffe A. P., Andrews M. T., Crawford E., Losa R., Brown D. D. (1987). Negative supercoiling is not required for 5 S RNA transcription in vitro. *Cell* **49**, 301–303.
- Yedvobnick B., Muskavitch M. A. T., Wharton K. A., Halpern M. E., Paul E., Grimwade B. G., Artavanis-Tsakonas S. (1985). Molecular genetics of *Drosophila* neurogenesis. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **50**, 841–854.

Глава 12

Регуляция экспрессии генов на уровне транскрипции: механизмы дифференциальной транскрипции генов

В чем бы ни заключалась конкретная работа генов, их функционирование можно отнести с уверенностью к категории процессов развития и, следовательно, к области эмбриологии. В настоящее время эта центральная проблема фундаментальной биологии атакуется со многих сторон как физиологами, так и генетиками; но в сущности она является эмбриологической проблемой.

К. УОДДИНГТОН (1956)

Мы вошли в клетку, нашу колыбель, и начали составлять опись обретенного нами богатства.

АЛЬБЕР КЛОД (1974)

ЭУКАРИОТИЧЕСКИЕ ГЕНЫ, КОДИРУЮЩИЕ БЕЛКИ

Экзоны и интроны

Одно из самых удивительных открытий семидесятых годов, десятилетия, отмеченного выдающимися открытиями, — выяснение структуры эукариотического гена. Генетики, изучающие бактерий, пришли к выводу, что белковый продукт колинеарен кодирующему его гену, т. е. 5'-конец РНК определяет аминоконцевую аминокислоту белка, и каждый кодон транслируется в аминокислоту до тех пор, пока не будет достигнут карбоксильный конец белка. В 1977 г. было обнаружено, что в случае некоторых мРНК эукариот дело обстоит иначе. Большинство расшифрованных с тех пор эукариотических генов оказались разорванными. Иными словами, 5'- и 3'-концы информационной РНК не происходят из одного непрерывного участка хромосомы. Между участками ДНК, кодирующими белок (**экзонами**), лежат промежуточные последовательности (**интроны**), которые не имеют никакого отношения к аминокислотной последовательности белка¹. На рис. 12.1 показана структура гена β -цепи гемоглобина че-

ловека. Этот ген состоит из следующих элементов:

1. **Область промотора**, ответственная за присоединение РНК-полимеразы и последующую инициацию транскрипции. Эта область содержит, как будет показано позже, три различных элемента и располагается с 95-й по 26-ю пару оснований перед сайтом инициации транскрипции (т. е. от -95-й до -26-й).
2. Последовательность АЦАТТТГ, на которой иницируется *транскрипция*. Ее часто называют **кэп-последовательностью**, потому что она кодирует 5'-конец РНК, который получит вскоре после транскрипции группу из модифицированных нуклеотидов — кэп (о чем будет говориться ниже).
3. **Кодон АТГ**, иницирующий *трансляцию*. Этот кодон лежит через 50 пар оснований после точки инициации транскрипции. Промежуточная область из 50 пар оснований между точками инициации транскрипции и трансляции называется **лидерной последовательностью**.
4. Экзон, содержащий 90 пар оснований, которые кодируют аминокислоты 1–30 в β -цепи гемоглобина человека.

¹ Известны, однако, интересные исключения (например, гены гистонов), когда таких промежуточных последовательностей в генах не содержится. Любая гипотеза, касающаяся функции этих последовательностей, должна учитывать такие исключения.

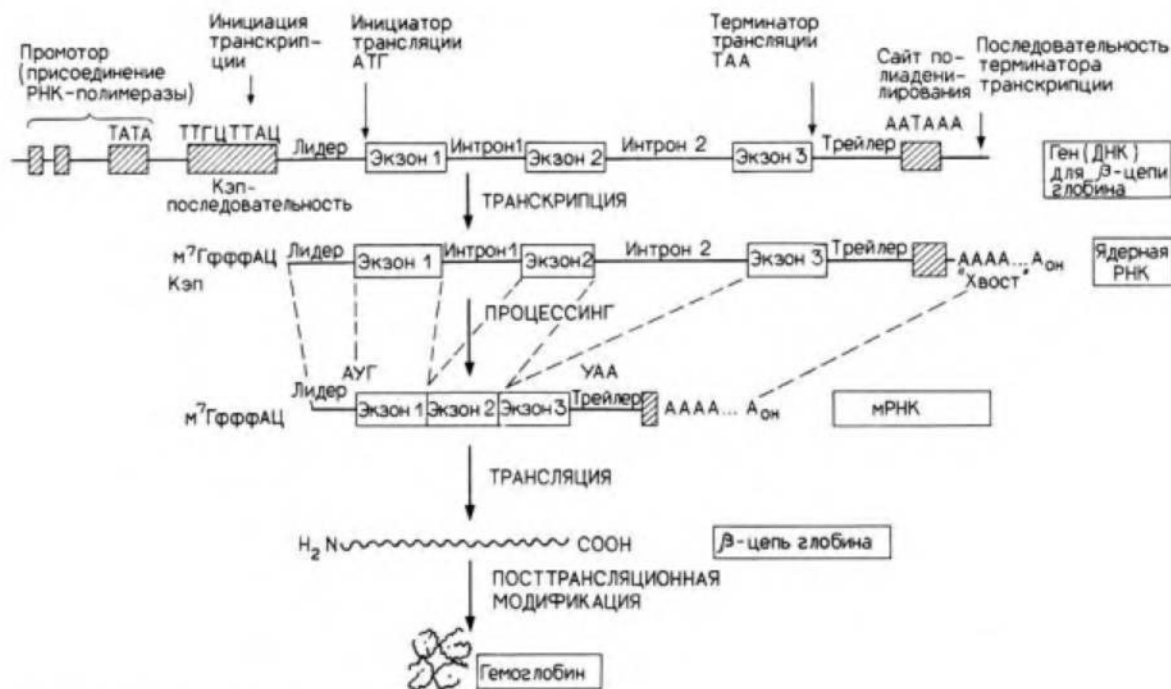


Рис. 12.2. Этапы формирования β -цепи глобина и гемоглобина.

5. Интрон из 130 пар оснований, который не содержит последовательностей, кодирующих гемоглобин.
6. Экзон, содержащий 222 пары оснований, которые кодируют аминокислоты 31–104.
7. Большой интрон – 850 пар оснований, – не вносящий вклада в белковую структуру гемоглобина.
8. Экзон, содержащий 126 пар оснований, которые кодируют аминокислоты 105–146.
9. Кодон терминации трансляции – ТАА.
10. Транскрибируемая 3'-концевая область, которая не транслируется в белок. Эта область включает последовательность ААТААА, которая необходима для присоединения к РНК-транскрипту «хвоста» приблизительно из 200–300 адениловых остатков. Этот поли(А)-конец вставляется в РНК примерно через 20 оснований после ААУААА-мотива. Однако прежде, чем транскрипция завершается, она продолжается после ААТААА-сайта на расстояние около 1000 нуклеотидов. В случае если в ААТААА-сайте возникла какая-либо мутация, поли(А)-хвост не добавляется и транскрипция не останавливается (Logan et al., 1987). В пределах транскрибируемой 3'-концевой области расположена последовательность **энхансера** (примерно 600–900 пар оснований от ААТААА-сайта), ко-

торая необходима для временной и пространственной организации экспрессии β -глобинового гена в предшественниках зрелых эритроцитов (Trudel, Constantini, 1987).

Изначальный ядерный РНК-транскрипт для такого гена содержит кэп-последовательность, лидерную последовательность, экзоны, интроны и 3'-нетранслируемый участок (рис. 12.2). Кроме того, оба конца транскрипта претерпевают модификацию. Концевая группа, названная **кэп-группой** (от англ. сар, что значит «шапочка»), состоящая из метилированного гуанозина, помещается на 5'-конце РНК. Таким образом, в отличие от предшественника мРНК, все нуклеотиды которого связаны в направлении от 5' к 3', кэп-структура присоединена в направлении от 5' к 5'. Это означает, что в ядерной РНК отсутствует свободная 5'-фосфатная группа (рис. 12.3). Молекулы зрелой информационной РНК содержат аналогичные кэп-группы, хотя остается неясным, действительно ли кэп-группа в мРНК является той самой, что была изначально получена в ядре. Известно также, что концевая 5'-кэп-группа необходима для присоединения мРНК к рибосоме (Shatkin, 1976).

3'-Конец обычно модифицируется в ядре путем присоединения хвоста примерно из 200 остатков аденилата. Эти остатки аденилатовой кислоты соединяются друг с другом ферментативно и добавляются к транскрипту. Они не кодируются последова-

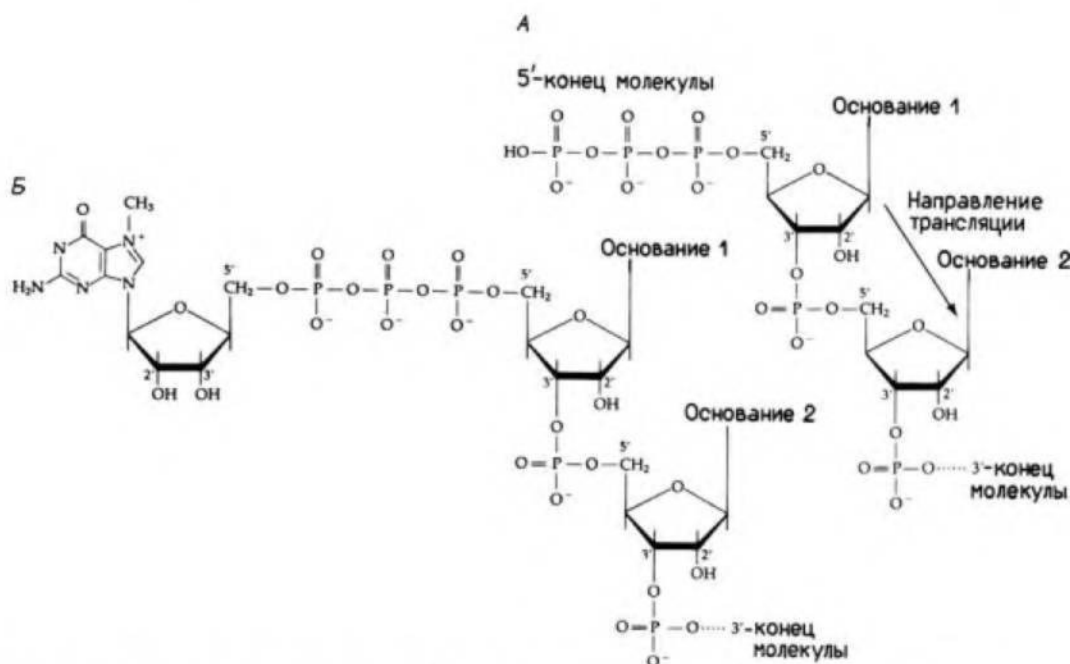


Рис. 12.3. Присоединение кэп-группы к 5'-концу мРНК эукариот. А. Исходный 5'-конец. Б. 5'-кэп. Показано добавление к мРНК 7-метилгуанозина в направлении 5' → 5'. Во многих мРНК наблюдается также метилирование 2'-гидроксильных групп первых двух оснований. (По Rottman et al., 1974.)

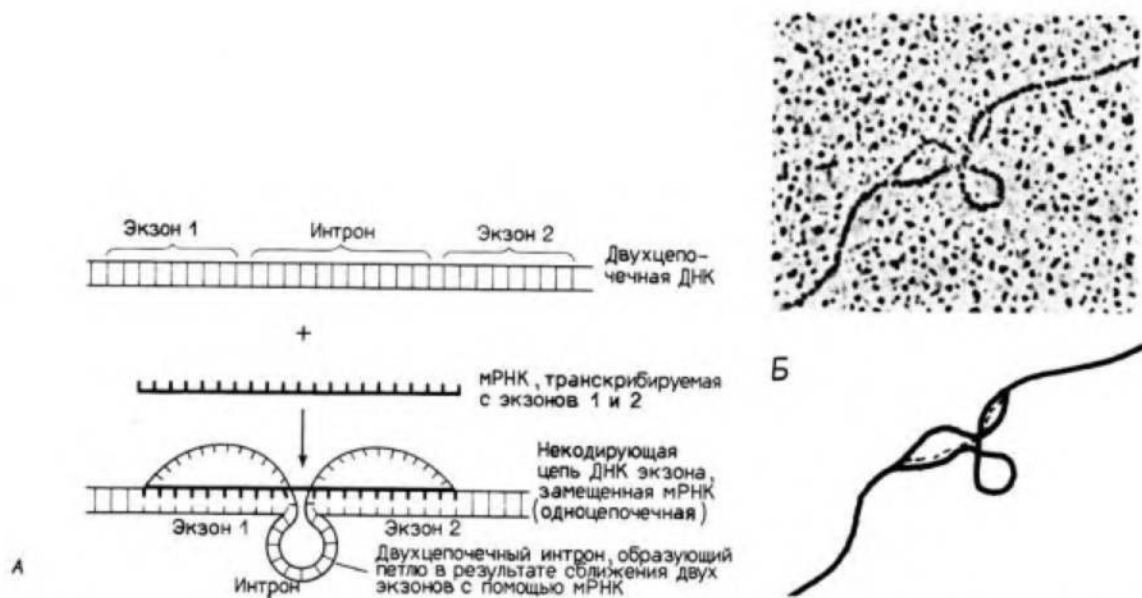


Рис. 12.4. Обнаружение интронов при картировании с вытеснением петли (R-петли). Ген β-цепи глобина мыши смешивают в формамиде с собственной мРНК. Присутствие формамида обеспечивает предпочтительную РНК-ДНК-гибридизацию, а не гибридизацию ДНК-ДНК. При замещении РНК гомологичной цепи ДНК вытесненная ДНК образует одноцепочечную R-петлю. При этом интрон, находящемуся между двумя кодирующими последовательностями, энергетически выгодно образовать двухцепочечную петлю. А. Схема, иллюстрирующая принцип картирования с R-петлей. Б. Электронная микрофотография, иллюстрирующая взаимодействие β-глобинового гена мыши и мРНК этого гена. В сопроводительной схеме сплошными жирными линиями обозначена ДНК, а тонкой штриховой линией — β-глобиновая мРНК. (Фотография из Tiemeier et al., 1978.)

тельностью гена. Обе модификации, 5'- и 3'-концов, могут защищать РНК от экзонуклеаз (Sheiness, Darnell, 1973; Gedamu, Dixon, 1978), стабилизируя таким образом мРНК и ее предшественник. Эти поли(А)-хвосты прогрессивно укорачиваются по мере старения мРНК. Новообразованная глобиновая мРНК в клетках мыши и кролика имеет около 150 адениловых остатков, тогда как старые РНК – 100, 60 или 40 аденилатов (Merkel et al., 1975; Nokin et al., 1976). Показано, что глобиновая мРНК, лишенная поли(А), быстро разрушается после инъекции ее в ооциты *Xenopus*. Глобиновая мРНК с поли(А)-хвостом существует в этих условиях более 20 ч (Marbaix et al., 1975).

Наличие интронов между кодирующими областями было выявлено с помощью электронного микроскопа (рис. 12.4). Информационная РНК β -цепи глобина связывается со специфическими участками ядерного гена, выпячивая интроны. Имеются разного рода данные, что эти интроны необходимы для того, чтобы последовательности мРНК покинули ядро и попали в цитоплазму, где они могут быть транслированы в белки. Во-первых, можно сконструировать искусственные вирусы так, что в них будет встроена часть глобинового гена. Затем этим вирусам дают возможность инфицировать клетки и транскрибировать РНК в ядрах. Если вирус содержит интрон (из глобинового гена или из вирусного гена), то в цитоплазме обнаруживаются стабильные последовательности глобиновой мРНК. Однако если интрон вируса или глобинового гена отсутствует, то последовательности глобиновой мРНК в цитоплазме не накапливаются (Hamer, Leder, 1979).

Во-вторых, как уже было отмечено ранее, некоторые индивидуумы страдают от болезни, называемой β^+ -талассемией; это заболевание характеризуется недостаточной продукцией β -цепей глобина. У больных имеются гены для β -цепей глобина, и транскрипция предшественников мРНК на этих генах проходит, по-видимому, нормально. Более того, мРНК этих больных правильно транслируется в аминокислотную последовательность β -цепи глобина человека. Дело заключается в количестве β -глобиновой мРНК. Следовательно, заболевание проявляется на уровне процессинга РНК. Это было показано с помощью пульсового мечения («pulse-chase») (Maquat et al., 1980). Развивающиеся эритроциты, выделенные из костного мозга больных, в течение 12 мин инкубировали с радиоактивными нуклеотидами («pulse»). Затем транскрипцию останавливали актиномицином D. Через различные интервалы времени («chase») из клеток выделяли РНК, которую подвергали электрофорезу для разделения молекул РНК по размерам, и затем гибридизовали эти РНК с β -глобиновой кДНК. У нормальных

индивидуумов вскоре после мечения появляется РНК длиной 1900 оснований. Несколько позже кДНК связывается с молекулами РНК, содержащими 1550, 1150, 960 и 880 оснований. Еще несколькими минутами позже 85% всей РНК представляет собой мРНК. В клетках от больных β^+ -талассемией наблюдается переизбыток промежуточных продуктов. Очень незначительная часть этих РНК имеет к 30 минутам размеры зрелой мРНК. Образовавшиеся промежуточные продукты разрушаются, вероятно, в ядре, и лишь немногие выходят в цитоплазму (Maquat et al., 1980; Kantor et al., 1980). Таким образом, β^+ -талассемия обусловлена дефектом в процессинге предшественника β -глобиновой мРНК. В результате секвенирования β -глобиновых генов нескольких больных было обнаружено, что они содержат мутации в первом интроне. Мутация в одном из этих генов показана на рис. 12.1 (Spritz et al., 1981). Итак, структура интрона оказывается существенной для процессинга и транспорта РНК из ядра в цитоплазму. Механизм такого сплайсинга и его значение для дифференциальной экспрессии генов будут обсуждаться в гл. 13.

Структура и функция промотора

Для осуществления правильной транскрипции необходимы регуляторные элементы двух типов. Регуляторные элементы первого типа называют **цис-регуляторами**. Они представляют собой специфические последовательности ДНК на данной хромосоме. Цис-регуляторы оказывают действие только на ближние гены. Второй тип называют **транс-регуляторами**. Это растворимые молекулы (включая белки и РНК), которые продуцируются одним геном, а взаимодействуют с другими генами на той же хромосоме или на других хромосомах. Если обратиться к индукции генов в *lac*-опероне *E. coli*, то можно вспомнить, что ген репрессора дает белок-репрессор, который взаимодействует с последовательностью оператора для генов *lac*-оперона. В этом случае оператор является цис-регуляторным элементом, так как он контролирует только *lac*-оперон своей собственной хромосомы. (Последовательность мутантного оператора на другой хромосоме может присоединять или не присоединять белок-репрессор.) Белок-репрессор, напротив, является транс-регулятором, поскольку он продуцируется одной хромосомой, а связывается с цис-регуляторным оператором на другой хромосоме (рис. 12.5).

В эукариотических генах, кодирующих мРНК, обнаружены два типа цис-регуляторных последовательностей ДНК – промоторы и энхансеры («усилители»). Промоторы обычно располагаются непосредственно перед сайтом, в котором начинается

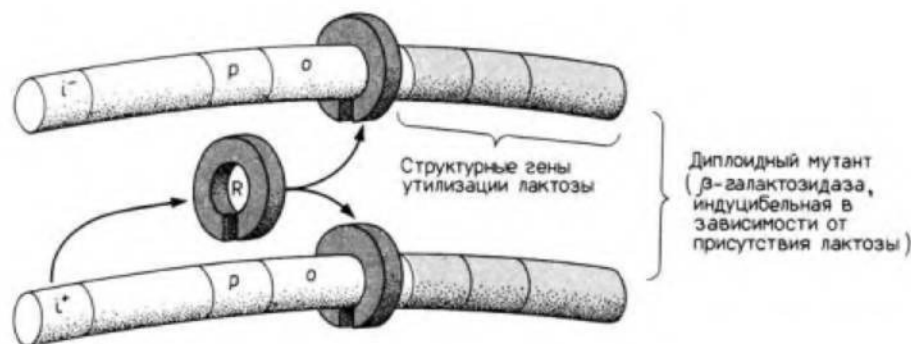


Рис. 12.5. Схема дифференциальной регуляции гена у *E. coli*; показаны *цис*- и *транс*-регуляторные элементы. В клетках дикого типа индуцибельное состояние характеризуется тем, что РНК для β -галактозидазы не транскрибируется, пока отсутствует лактоза. В отсутствие лактозы белок-репрессор (R), кодируемый геном *i*, присоединяется к сайту оператора (*o*), ингибируя этим транскрипцию РНК-полимеразой с промотора (*p*). Если лактоза присутствует, то она связывается с белком-репрессором, в результате репрессор не может присоединиться к ДНК и транскрипция продолжается. Растворимая природа этого репрессора показана в опытах на мутантах *E. coli*. Когда гаплоидные бактериальные клетки, несущие ген i^- , становятся частично диплоидными с геном *i* дикого типа (i^+), синтезируется репрессор дикого типа, который способен сделать индуцибельным исходный ген β -галактозидазы. Этот белок-репрессор является *транс*-регуляторным элементом. Последовательности промотора и оператора представляют собой *цис*-регуляторные элементы.

транскрипция, и длина их составляет приблизительно 100 пар оснований. Участок промотора необходим для присоединения РНК-полимеразы II и точной инициации транскрипции. Энхансер активирует утилизацию промотора, контролируя эффективность и скорость транскрипции с этого конкретного промотора. Энхансеры активируют только лежащие в *цис*-положении промоторы (т.е. промоторы на той же самой хромосоме), но они могут функционировать и на больших расстояниях. Кроме того, они могут находиться не только на 5'-стороне гена, но и на другой цепи ДНК (Maniatis et al., 1987).

Промоторы генов, которые транскрибируют относительно большие количества мРНК, имеют сходную структуру. В них содержится последовательность АТА (называемая иногда ТАТА-боксом или боксом Голдберга – Хогнесса), располагающаяся на расстоянии приблизительно 30 пар оснований с 5'-стороны от сайта, где начинается транскрипция, и один или несколько **передних элементов промотора**, лежащих еще дальше с 5'-стороны. Передний элемент промотора обычно представляет собой вариацию последовательности ЦААТ, но выявлены и другие промоторные элементы (Grosschedl, Birnstiel, 1980; McKnight, Tjian, 1986) (рис. 12.6).

Впервые промотор β -глобинового гена исследовали в опытах по проверке специфической транскрипции клонированной ДНК. Клонированные гены могут транскрибироваться правильно, когда они введены в ядра ооцитов лягушки или фибробластов или когда они инкубируются с очищенной РНК-полимеразой в присутствии нуклеотидов надосадочной жидкости (Wasylyk et al., 1980). После того как

транскрипция гена подтверждена, для получения специфических делеций в этом гене или окружающих его участках используют рестриктазы. Затем можно выяснить, продолжает ли правильно транскрибироваться такой модифицированный ген. Результаты этих исследований показали, что для максимальной транскрипции β -глобинового гена достаточно первых 109 пар оснований, предшествующих кэп-сайту (Grosveld et al., 1982; Dierks et al., 1983).

Другие исследователи уточнили этот вывод с помощью клонирования участка глобинового гена мыши от 106-й пары оснований выше (с 5'-стороны) старта транскрипции (положение –106) вплоть до 475-й пары оснований (положение +475) в первом экзоне (Myers et al., 1986). Эти клоны были подвергнуты мутагенезу *in vitro*. Таким способом в область промотора глобинового гена было введено

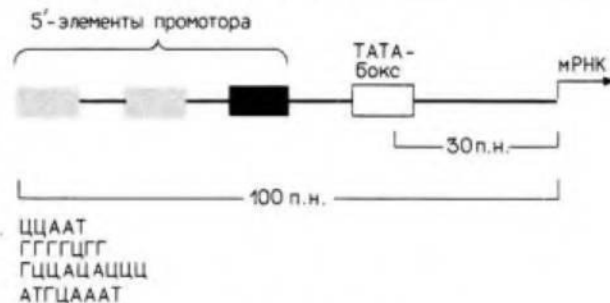


Рис. 12.6. Типичный промотор для гена эукариот, кодирующего белок. Представленный ген содержит ТАТА-боксы и три 5'-элемента промотора. Примеры таких 5'-элементов представлены в нижней части рисунка. (По Maniatis et al., 1987.)

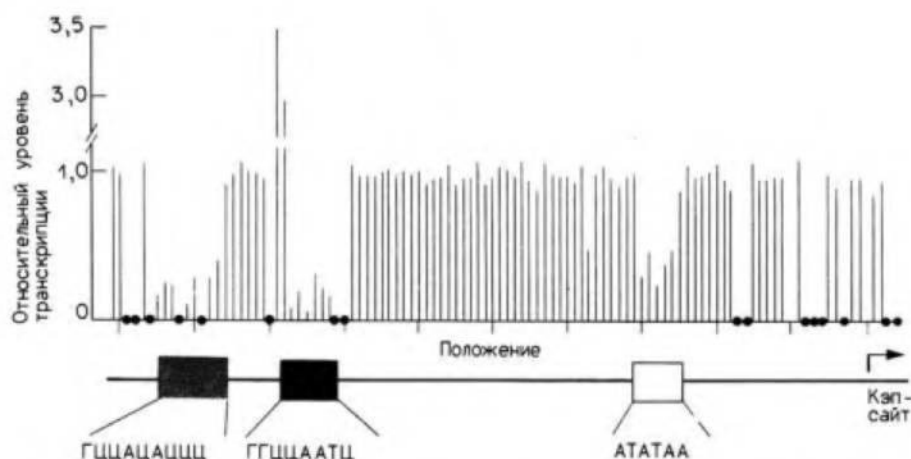


Рис. 12.7. Влияние отдельных точковых мутаций в промоторе β -глобинового гена мыши на способность промотора к инициации транскрипции. Каждая линия представляет уровень транскрипции с мутантного промотора по отношению к уровню транскрипции с глобинового промотора дикого типа, определяемому в параллельных опытах. Черными точками указаны нуклеотиды, для которых не были получены мутации. Под гистограммой представлена схема, показывающая положение ТАТА-бокса и двух 5'-элементов промотора в гене β -цепи глобина мыши. (Из Maniatis et al., 1986.)

130 различных одиночных замен оснований. Полученные клонированные гены вводили в плазмиды, содержащие энхансер, и затем с помощью трансфекции – в культивируемые клетки, которые в обычных условиях не синтезируют глобин. Будут ли в таких клетках транскрибироваться усеченные глобиновые мРНК (475 оснований) с этих клонов? Результаты опытов показаны на рис. 12.7. В боль-

шинстве случаев мутации в 5'-фланкирующей области не влияли на эффективность транскрипции глобинового гена. Однако мутации в трех кластерах нуклеотидов резко снижали транскрипцию. Один кластер находился в ТАТА-боксе (боксе Голдберга – Хогнесса), другой – в переднем ЦААТ-элементе промотора, а третий – в участке ГЦЦАЦАЦЦ, от 95-й до 87-й пары оснований выше кэп-сайта.

Таблица 12.1. Основные элементы промотора, общие для разных генов

Ген	ЦААТ-участок ¹⁾	ТАТА-участок ¹⁾
Гистон		
Н2А (морской еж)	ГГАЦААТТГ (–85)	ТАТАААА (–34)
Н2В (морской еж)	ГАЦЦААТГА (–92)	ТАТАААА (–26)
Н3 (морской еж)	ГАЦЦААТЦА (–75)	ТАТАААТ (–30)
Н2А (дрозофила)	АГТЦААТТС	ТАТАААТ
Н3 (дрозофила)	ЦГТЦАААТГ	ТАТААГТ
Глобин		
α (мышь)	АГЦЦААТГА (–88)	ЦАТАТАА (–29)
$\alpha 2$ (человек)	АГЦЦААТГА (–70)	ЦАТАААЦ (–28)
Коллаген		
$\alpha 2$ тип 1 (курица)	ГЦЦЦАТТГЦ (–78)	ТАТАААТ
Инсулин		
Человек	ГГЦЦАГГЦГ (–73)	ТАТАААГ (–29)
Крыса 1	ГГЦЦАААЦГ (–78)	ТАТАААГ (–30)
Овальбумин	ГГТЦАААЦТ (–74)	ТАТАТАТ (–31)
Кональбумин	ГГАЦАААЦА (–81)	ТАТАААА (–30)
Фибрион шелка	ГТАЦАААТА (–93)	ТАТАААА (–29)

Источник: Efstratiadis et al. (1980); Vogeli et al. (1981).

¹⁾ Числа в скобках указывают положение в 5'-области от точки, где иницируется транскрипция.

Во многих эукариотических промоторах ЦААТ- и ТАТА-боксы являются необходимыми элементами (Efstratiadis et al., 1980) (табл. 12.1), а последовательность ГЦАЦАЦЦ не наблюдается нигде, за исключением промоторов β -глобиновых генов у нескольких видов. У человека эта последовательность является, по-видимому, критической, поскольку мутации, возникшие в ней естественным образом, полностью прекращают транскрипцию β -глобинового гена (Orkin, Kazazian, 1984). Две мутации в положениях -78 и -79 в действительности увеличивают транскрипцию в три раза по отношению к уровню дикого типа. Полагают, что эти замены способствуют взаимодействию промотора с *транс*-регуляторными белками.

Связывание *транс*-регуляторных белков с промоторами

В большинстве клеток эукариот имеются РНК-полимеразы трех типов; ферментом, ответственным за транскрипцию молекул мРНК, является **РНК-полимераза II**. Однако очищенная РНК-полимераза II не может узнавать последовательность промотора в отсутствие других факторов в ядрах. Без этих факторов транскрипция иницируется на случайных последовательностях. Поэтому транскрипция будет неправильной в случае, если инкубировать клонированные гены только с очищенной РНК-полимеразой II и нуклеотидтрифосфатами. Если же добавить ядерные экстракты, то транскрипция будет проходить правильно. Что это за факторы? Из ядер клеток дрозофилы были изолированы два фактора, необходимые для транскрипции нескольких генов (включая два гена гистонов и ген актина) (Parker, Topol, 1984). Один из них связывается, по-видимому, с передним элементом промотора, а другой присоединяется к ТАТА-боксу. Из клеток млекопитающих также были изолированы белки, связывающиеся с ТАТА-боксом (Davison et al., 1983; Shi et al., 1986). Другой ядерный белок (CTF) присоединяется к переднему ЦААТ-элементу промотора и необходим для транскрипции с нескольких ЦААТ-содержащих промоторов, а ядерный белок Sp1 специфически связывается с промоторной последовательностью ГГЦГГ (Dyban, Tjian, 1985; Jones et al., 1987). Помимо этого в ядрах существуют другие белки, которые образуют стабильный комплекс с РНК-полимеразой без взаимодействия с ДНК (Zheng et al., 1987). Не исключено, что эти факторы находятся во всех клетках и поэтому не могут регулировать дифференциальную экспрессию генов. Однако они могут быть вовлечены во взаимодействие между участком промотора и участком энхансера таким образом, что будет происходить диф-

ференциальная транскрипция определенных генов в определенных клетках.

Существует еще одна группа ядерных белков, характерных для ограниченного набора клеток и способных регулировать транскрипционную экспрессию генов. К числу таких белков относится GHF-1 – пептид, обнаруживаемый только в клетках передней доли гипофиза. Эксперименты по ДНК-футпринтингу показали, что GHF-1 присоединяется к 5'-элементу промотора в гене гормона роста человека. Если клонированные гены гормона роста добавить в ядерные экстракты из негипофизарных клеток, то эти гены не транскрибируются. Вместе с тем транскрипция будет происходить, если гены гормона роста добавить к ядерным экстрактам из клеток передней доли гипофиза. Более того, добавление GHF-1 к ядерному экстракту негипофизарных клеток позволяет экстракту транскрибировать ген гормона роста (Bodner, Karin, 1987). Из этого следует, что специфическая экспрессия гена гормона роста в передней доле гипофиза может быть опосредована тканеспецифичным белком, связывающимся с промотором.

Структура и функция энхансеров

Помимо промоторов обеспечивать механизм дифференциальной транскрипции генов может другой тип *цис*-регуляторных участков. Эти последовательности ДНК называют **энхансерами**. Впервые они были открыты в вирусах, однако в настоящее время известно, что они имеются и в клетках эукариот. Один из первых обнаруженных клеточных энхансеров контролирует клеточную специфичность транскрипции генов иммуноглобулинов. Джиллис и др. (Gillies et al., 1983) с помощью трансфекции вводили клонированный ген тяжелой цепи иммуноглобулина в культивируемые опухолевые В-лимфоциты, которые утратили способность продуцировать свои собственные тяжелые цепи. С этой целью клонированный ген добавляли в раствор фосфата кальция и смешивали с лимфоцитами. В небольшом проценте случаев этот ген попадал в клетки и встраивался в ядерные хромосомы. Полученные трансфицированные клетки миеломы приобретали способность синтезировать тяжелую цепь, кодируемую встроившимся геном. Однако если вводился тот же самый ген, но без небольшого участка интрона между вариативной и константной областями, то транскрипция этого гена была очень незначительна. Внутри интрона существовал участок, необходимый для транскрипции (рис. 12.8).

Потребность в энхансерной последовательности может объяснить, почему не происходит беспорядочной транскрипции со всех промоторных последовательностей в генах вариативной области, по-

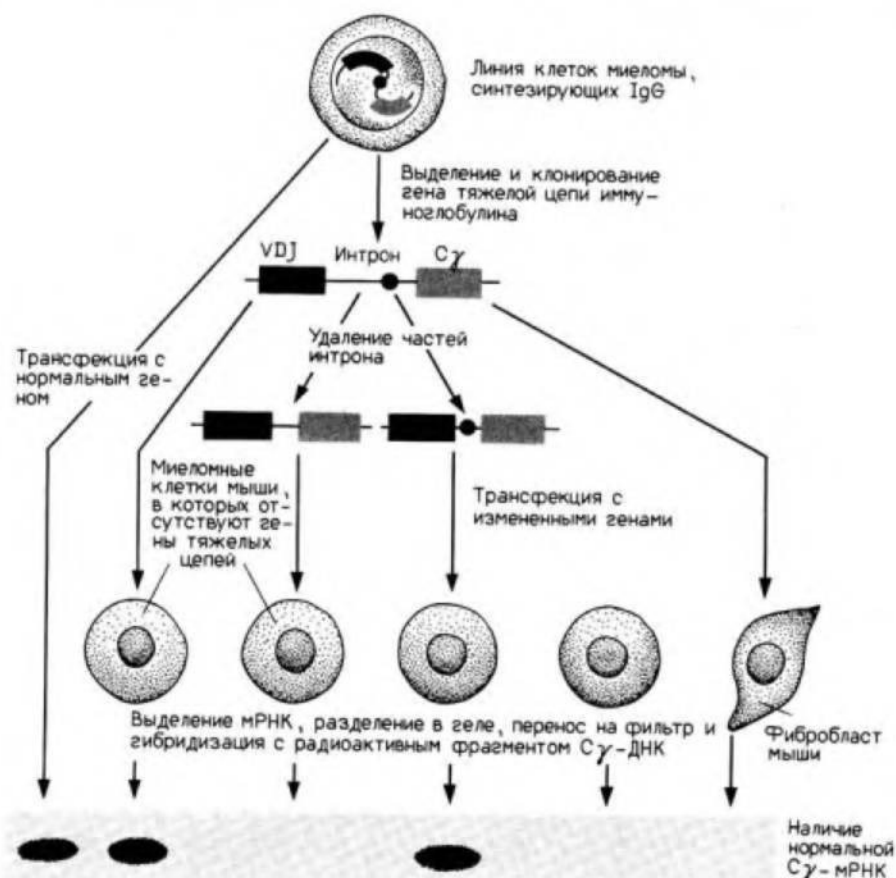


Рис. 12.8. Тканевая специфичность влияния энхансерного элемента. Ген тяжелой цепи иммуноглобулина был выделен из линии клеток миеломы, синтезирующих IgG, и клонирован. В исходных клетках сегменты VDJ были транслоцированы (как обсуждалось в гл. 10) в участок вблизи локуса Cγ. Одни клоны сохраняли интактными, тогда как в других удаляли с помощью рестриктаз различные части интрона между экзонами VDJ и Cγ. ДНК полученных клонов трансфицировали в миеломные клетки, которые утратили собственные гены иммуноглобулинов. Затем из трансфицированных клеток выделяли образовавшуюся мРНК и фракционировали ее с помощью электрофореза в полиакриламидном геле вместе с мРНК из линии трансфицированных фибробластов мыши и из исходных клеток миеломы. РНК переносили с помощью блоттинга на нитроцеллюлозный фильтр и гибридизовали с радиоактивным фрагментом из участка Cγ. В случае если участок Cγ транскрибируется с клонированных генов, радиоактивный зонд должен присоединяться к нему. С помощью зонда было показано, что Cγ-мРНК синтезируется только в тех клонах, которые содержали определенный участок интрона (отмечены пятнами). Однако после трансфекции в фибробласты мыши даже полный клонированный ген не транскрибировал Cγ-мРНК. (Протокол и данные из Gillies et al., 1983.)

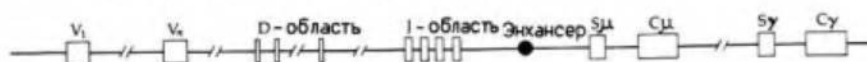
сколько для того, чтобы функционировать, промотор должен быть размещен вблизи энхансера. При переключении классов участок энхансера остается у фрагмента VDJ (рис. 12.9). Энхансеры могут объяснить также тканеспецифическую транскрипцию, так как клонированные гены иммуноглобулинов *не транскрибируются* после введения в ядра клеток, не являющихся В-лимфоцитами (Gillies et al., 1983; Banerji et al., 1983). Кроме того, если участок энхансера тяжелой цепи иммуноглобулина встроен в клонированный ген β-цепи глобина, то он более чем в 100 раз стимулирует транскрипцию этого гена после его введения в клетку миеломы. Таким обра-

зом, перед нами — специфический участок ДНК, который стимулирует транскрипцию лежащих поблизости генов в клетках определенного типа.

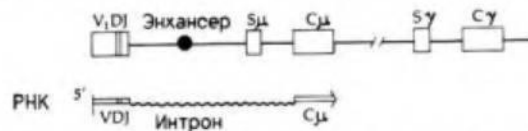
Энхансеры, активность которых регулируется во времени

Известны энхансерные последовательности, которые регулируют или время экспрессии генов, или специфичность экспрессии, или то и другое одновременно. Одно из наиболее резких по времени переключений генной активности наблюдается при переходе к средней бластуле (ПСБ) у зародышей

А. Ген в клетках зародышевой линии: транскрипция отсутствует



Б. Перестроенный ген: транскрипция иммуноглобулина



В. Ген после переключения классов: транскрипция иммуноглобулина нового класса



Рис. 12.9. Модель функционирования энхансера иммуноглобулинов. А. Участок энхансера тяжелой цепи иммуноглобулина включает последовательности между сегментами J-области гена и последовательностями-переключателями (Sμ), предшествующими Cμ. При делении этого участка транскрипция резко уменьшается. 5'-промотор предшествует каждому сегменту V-области гена и расположен исходно на значительном расстоянии от энхансера. Б. VDJ-перестройка гена сближает один из промоторов с энхансером и обеспечивает транскрипцию. В. В ходе переключения классов энхансер остается с VDJ-сегментами, когда они помещаются рядом с новой константной областью (Cγ).

лягушки. Было обнаружено, что определенные гены содержат энхансер, который в это время специфично активируется (Krieg, Melton, 1987). Как показано на рис. 10.34, гены, которые активируются на этой переходной стадии, можно клонировать. Крэг и Мелтон присоединили первые 500 пар оснований из 5'-фланкирующей области одного из этих генов к β-глобиновому гену *Xenopus*. Обычно после инъекции в оплодотворенные яйца лягушки β-глобиновый ген не транскрибируется вплоть до поздних стадий развития. Если последовательности, лежащие с 5'-стороны от ПСБ-активируемого гена, содержат такой временной энхансер, то можно надеяться, что, начиная со времени перехода к средней бластуле, будет обнаруживаться глобиновая мРНК. Результаты экспериментов по нозери-блот-гибридизации показали, что это действительно так. Глобиновые транскрипты отсутствовали до перехода к средней бластуле, но их можно было обнаружить после такого перехода. С помощью последовательных делений была определена локализация этого энхансера средней бластулы – в последовательности длиной 74 пары оснований на расстоянии приблизительно 700 пар оснований с 5'-стороны от обычного промотора.

β-Глобиновый ген человека имеет, по-видимому, свой собственный временной энхансер, лежащий между 600-й и 900-й парами оснований после поли(А)-сайта. Если фрагмент ДНК, содержащий этот участок, помещают около γ-глобинового гена

человека, то в то время, когда обычно экспрессируется β-глобиновый ген, может активироваться ген фетального гемоглобина. (Trudel, Constantini, 1987).

Тканеспецифические энхансеры

Помимо энхансеров, описанных в предыдущем разделе, обнаружены также тканеспецифические энхансеры, подобные энхансеру гена тяжелой цепи иммуноглобулина. В поджелудочной железе гены экзокринных белков (химотрипсина, амилазы и трипсина) имеют энхансеры, отличающиеся от энхансеров эндокринного белка инсулина. Энхансеры обоих типов лежат в 5'-фланкирующих последовательностях соответствующих генов. Эти фланкирующие области были помещены на ген бактериальной хлорамфениколацетилтрансферазы – ген, ферментный продукт которого не обнаруживается в клетках млекопитающих (Walker et al., 1983). Затем эти гибридные гены трансфицировали в: а) клетки яичника; б) клеточную линию, секретирующую инсулин; в) линию экзокринных клеток и определяли активность маркерного фермента в клетках каждого из этих типов. Как показано на рис. 12.10, ни одна из энхансерных последовательностей не индуцировала образование фермента в клетках яичника. Однако в клетке, секретирующей инсулин, 5'-фланкирующая область инсулинового гена позволяла экспрессироваться гену хлорамфениколацетилтрансферазы, а 5'-фланкирующая об-

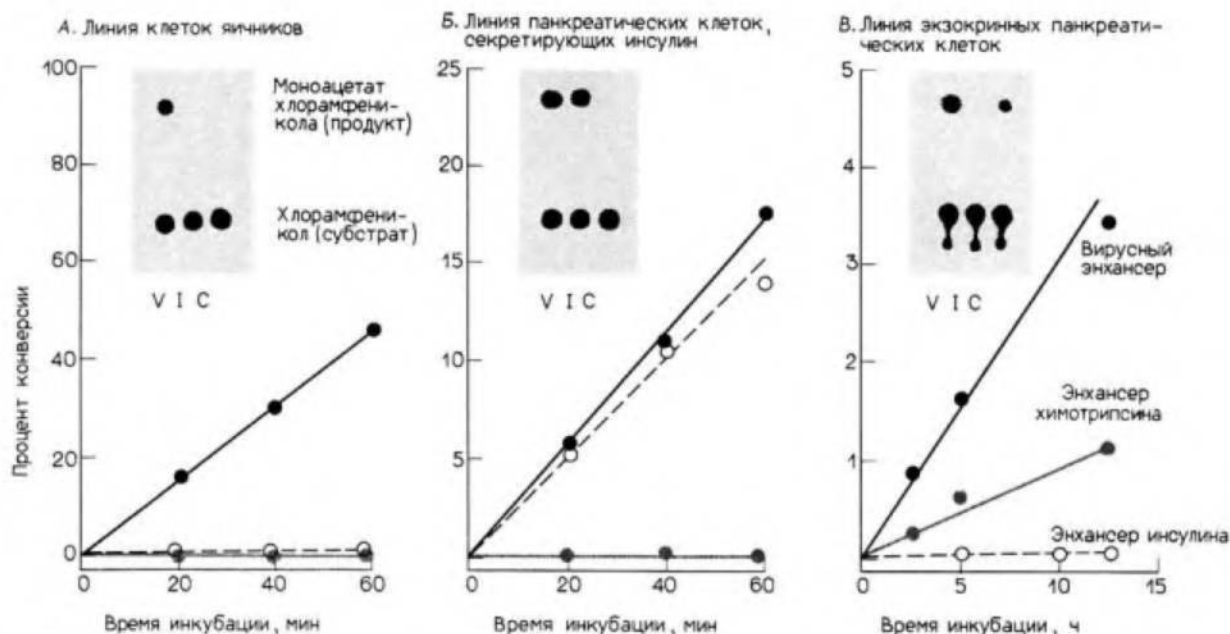


Рис. 12.10. Тканевая специфичность энхансеров генов поджелудочной железы. 5'-фланкирующие участки гена инсулина (I) и гена химотрипсина (C) были встроены по отдельности за геном бактериальной хлорамфениколацетилтрансферазы (CAT). В качестве положительного контроля за геном CAT был помещен также энхансер вируса саркомы Рауса (V), который функционирует, по-видимому, в клетках всех типов. Три полученных клон были трансфицированы в клетки трех типов, после чего в клеточных лизатах определяли активность CAT. На вставках показаны типичные радиоавтограммы измерений активности CAT с помощью хроматографии, при которой радиоактивный хлорамфеникол (субстрат для реакции, катализируемой CAT) мог быть отделен от моноацетата хлорамфеникола (продукта реакции, катализируемой CAT). (По Walker et al., 1983.)

ласть гена химотрипсина не давала такой возможности. Напротив, когда клоны вводили в линию экзокринных панкреатических клеток, 5'-фланкирующая последовательность для химотрипсина позволяла экспрессироваться гену хлорамфениколацетилтрансферазы, а инсулиновый энхансер не позволял. Таким образом, экспрессия генов в экзокринных и эндокринных клетках поджелудочной железы контролируется, очевидно, различными энхансерами.

Нет ничего необычного в том, что один и тот же белок синтезируется в клетках не одного, а нескольких типов. Это справедливо для желточного белка, который продуцируется у зрелых самок дрозофилы. Два гена этого желточного белка — *up1* и *up2* — лежат по соседству, но транскрибируются в противоположных направлениях (рис. 12.11). Оба гена транскрибируются в яичнике и жировых телах. Эти гены могут быть отделены друг от друга с помощью рестриктазы, которая расщепляет их общую 5'-фланкирующую область (Garabedian et al., 1985). Затем каждый из этих генов может быть клонирован отдельно в векторе мобильного Р-элемента, который способен встраиваться в геном яиц дрозофилы.

Прежде чем трансформировать ДНК дрозофилы этими клонами, в гены *up* были введены дополнительные фрагменты плазмидной ДНК, для того чтобы продукты этих генов можно было отличить от продуктов эндогенных генов. Транскрипты с рекомбинантных клонов, подобно эндогенным мРНК, оказались специфичными в отношении пола (они присутствовали только у самок) и стадии развития (обнаруживались только у взрослых особей). Однако *up2*-мРНК была обнаружена только в яичнике, а *up1*-мРНК — только в жировых телах. Исходные гены желточного белка должны, очевидно, иметь на своих 5'-концах два энхансера, один — разрешающий транскрипцию в яичнике и другой — разрешающий транскрипцию в жировых телах. Таким образом, оба гена транскрибируются в норме в клетках обоих типов. Рестриктаза, однако, разрезает ДНК между этими двумя сайтами, оставляя для *up1* энхансер, специфичный для жирового тела, а для *up2* энхансер, специфичный для яичника.

Было обнаружено, что энхансер гена *up1*, специфичный для жирового тела, располагается в сегменте ДНК между 196-й и 321-й парами оснований выше (с 5'-стороны от) кэп-сайта. Это определили с помощью добавления различных фрагментов 5'-

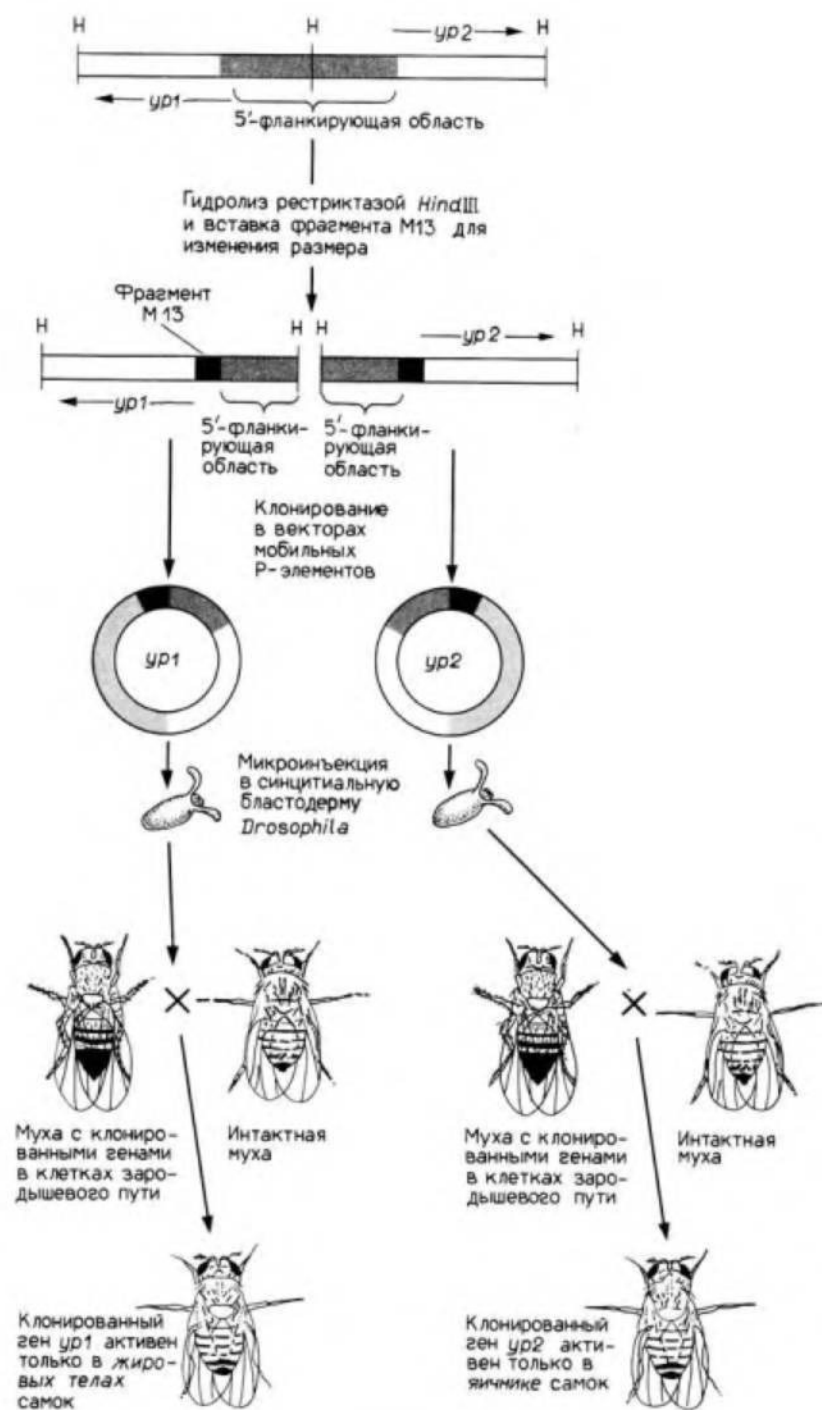


Рис. 12.11. Протокол идентификации двух отдельных энхансерных элементов, контролирующих тканевую специфичность транскрипции желточных белков и их 5'-фланкирующие элементы отделяли друг от друга с помощью рестриктаз (*Hind*III) обозначена как Н). Затем эти гены модифицировали присоединением добавочной ДНК к экзону и клонировали в мобильном Р-элементе. В синцитиальную бластодерму с помощью микроинъекции вводили рекомбинантный Р-элемент, который включался в некоторые ядра. Иногда Р-элемент попадал в клетки зародышевой линии. Такие мухи затем спаривались с интактными особями. Потомство, которое получило гены Р-элемента, можно было идентифицировать по окраске глаз (благодаря генетическому маркеру в Р-элементе), а отдельные органы могли быть тестированы на присутствие транскриптов *ur1* и *ur2*.

фланкирующей последовательности к гену β-галактозидазы *E. coli*. Полученные гены клонировали в Р-элементе, который затем вводили зародышам, как это было описано ранее. Потомство тех зародышей, которые включили Р-элемент, окраши-

вали на β-галактозидазу (Garabedian et al., 1986). Результаты можно видеть на цветной фотографии, помещенной на одной из сторон обложки книги. В жировом теле и яичнике в отсутствие 5'-фланкирующей области β-галактозидаза не выявляется.

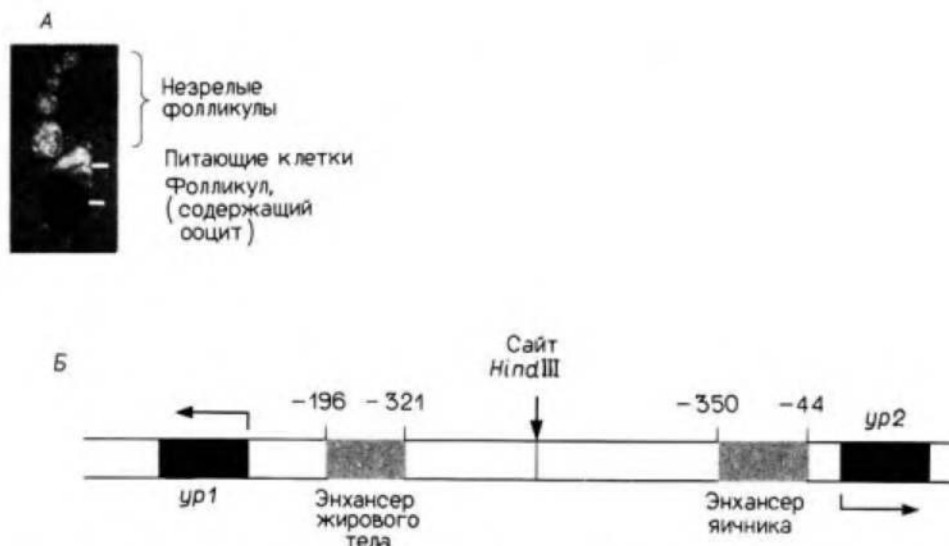


Рис. 12.12. Локализация энхансерных элементов желточных белков. А. Экспрессия гена бактериальной β -галактозидазы с присоединенным участком от -44 до -350 с 5'-стороны гена *ur2* в яичниках *Drosophila*. Клетки, экспрессирующие β -галактозидазу, окрашены в темный цвет. Б. Схема энхансеров желточных белков у дрозофилы. (Полученные сравнительно недавно данные предполагают также наличие третьего элемента, расположенного между положениями -100 и +1 гена *ur2* и увеличивающего транскрипцию обоих генов.) (Фотография с любезного разрешения Р. Wensink.)

Если добавляли целую 5'-фланкирующую область гена *ur1*, то жировые тела, но не яичник, окрашивались в черный цвет (только у самок). Эта специфическая транскрипция сохранялась, когда использовали фрагмент от -321-го до -196-го положения.

Следовательно, специфичная для жирового тела транскрипция регулируется участком ДНК, длиной 125 пар оснований, который расположен между -196-м и -321-м положениями. Сходным образом последовательность энхансера, отвечающего за спе-

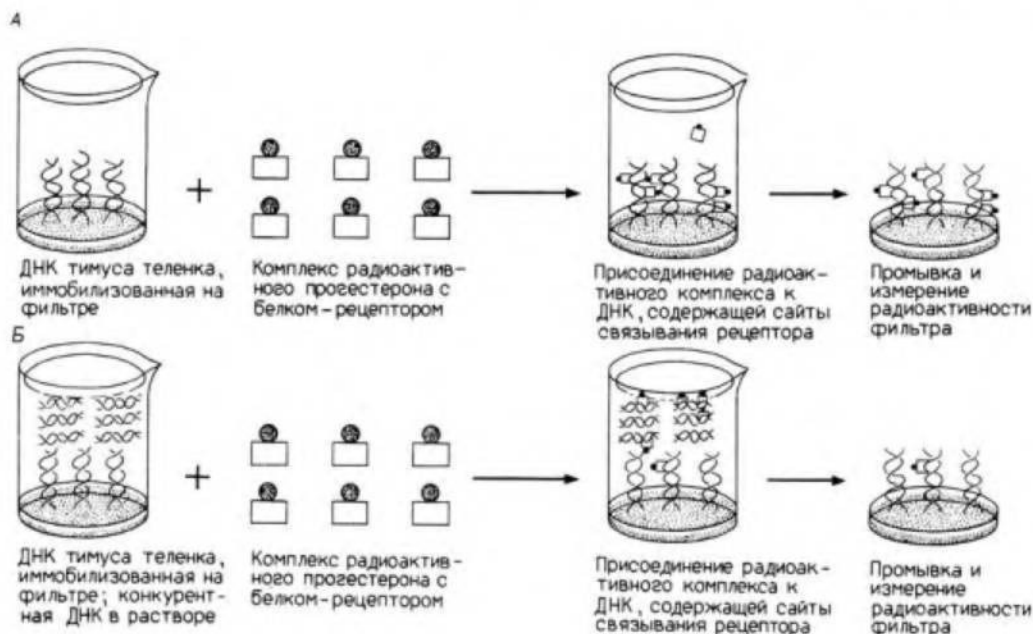


Рис. 12.13. Протокол определения сайта энхансера глюкокортикоидов. Подробности см. в тексте.

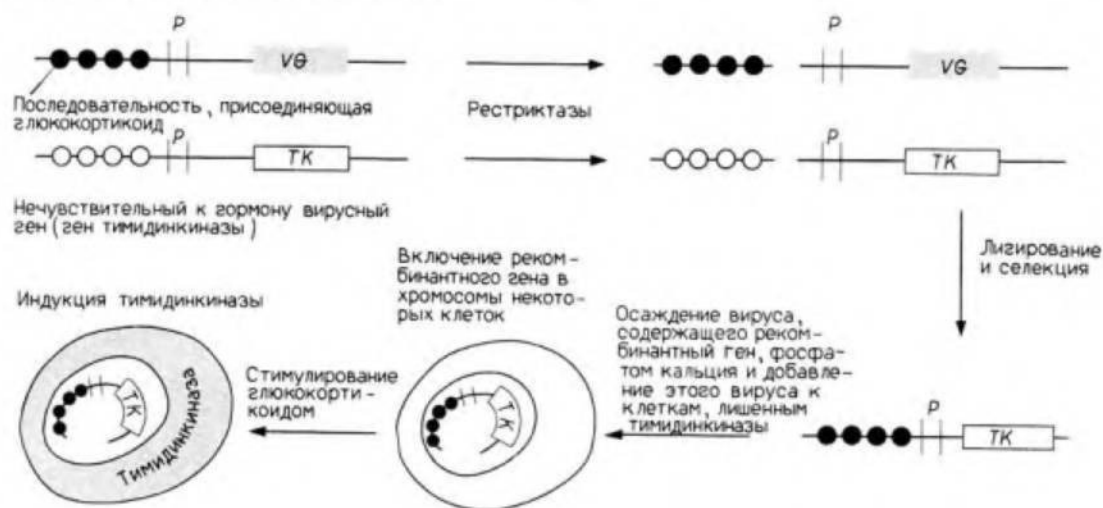
цифическую для яичника транскрипцию, была локализована в области 44–350 пар оснований выше гена *yp2* (рис. 12.12).

Энхансеры, реагирующие на гормоны

В ходе развития нередко приходится наблюдать координированную регуляцию экспрессии генов. Это

явление имеет место, когда в клетках одного типа одновременно синтезируются несколько специфичных для них белков или когда какой-либо гормон индуцирует экспрессию нескольких генов в клетках различного типа. Накапливающиеся данные свидетельствуют о том, что по крайней мере в некоторых случаях координированная регуляция генов осуществляется, когда различные структурные гены

А. Чувствительный к гормону вирусный ген



Б

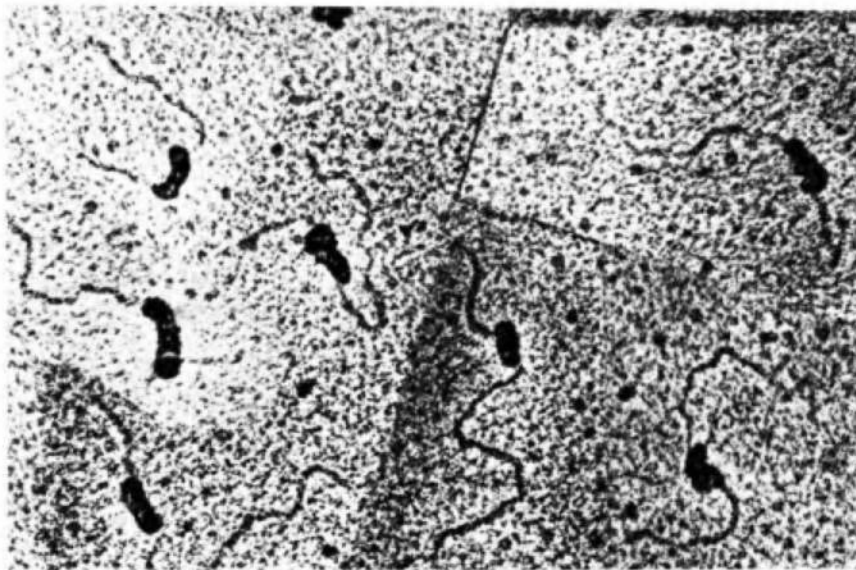


Рис. 12.14. Тест на последовательность энхансера глюкокортикоидов. А. Рекомбинантный вирус, содержащий чувствительный к глюкокортикоидам энхансер вируса рака молочной железы мыши и ген тимидинкиназы вируса *Herpes simplex*, может интегрироваться в геном клетки, лишенной гена тимидинкиназы. При обработке глюкокортикоидами рекомбинантный ген транскрибирует вирусную тимидинкиназу. P – промотор; TK – ген тимидинкиназы; VG – ген вируса рака молочной железы мыши. Б. Электронная микрофотография энхансерных элементов глюкокортикоидов, показывающая связь рецептора гормона с данным участком гена. (А – с изменениями из Chandler, 1983; Б – из Payver et al., 1983; фотография с любезного разрешения К. R. Yamamoto.)

присоединены к одинаковым или похожим энхансерам. В поджелудочной железе энхансеры для десяти эндокринных белков имеют консенсусную последовательность из 20 пар оснований. Это позволяет предположить, что похожие последовательности участвуют в активации данных генов в экзокринных клетках поджелудочной железы (Boulet et al., 1986).

Известно, что стероидные гормоны увеличивают транскрипцию многих генов. Полагают, что эти гормоны связываются белковым рецептором, который в такой форме способен специфически присоединяться к определенным последовательностям ДНК (Miesfeld et al., 1986). Одну из групп стероидных гормонов составляют глюкокортикоиды (кортизон, гидрокортизон и синтетический гормон дексаметазон), которые регулируют метаболизм белков и подавляют воспалительные процессы в тканях. Они, по-видимому, функционируют во всех типах клеток. Несколько генов, среди которых гены металлотионина млекопитающих и некоторые гены опухолевых вирусов, активируются глюкокортикоидами, поэтому было естественно предположить, что последовательность ДНК, связывающая рецептор с присоединенным гормоном, лежит рядом с этими генами. Один из способов определения глюкокортикоидного энхансера гена заключается в проведении конкурентного связывания, как показано на рис. 12.13. Вначале двухцепочечную ДНК из тимуса телят (которая, как полагают, имеет много сайтов связывания прогестерона) фиксируют на целлюлозных фильтрах и затем добавляют комплекс радиоактивного глюкокортикоида с рецептором. Этому комплексу позволяют связаться с ДНК и определяют связавшуюся радиоактивность. Затем проводится тот же опыт в присутствии избытка какой-либо другой ДНК в растворе. Если в этой конкурирующей ДНК имеется сайт связывания комплекса глюкокортикоид-рецептор, то она будет конкурировать за радиоактивный комплекс и к ДНК тимуса телят будет присоединяться меньшее количество радиоактивности (Pfahl, 1982). Используя различные фрагменты ДНК, полученные с помощью рестриктаз, исследователи постулировали, что последовательность ТГГТАЦАААТГТТЦТ способна выполнять роль глюкокортикоидного энхансера (Karin et al., 1984). Было показано, что эти последовательности, связывающие глюкокортикоид, функционируют как энхансеры после их присоединения к генам, активность которых в обычных условиях не зависит от гормона (рис. 12.14; Chandler et al., 1983). В результате эти гены приобретают чувствительность к глюкокортикоиду.

Энхансерные элементы, специфичные к стероидам, очень похожи друг на друга и узнаются близкородственными белками. Каждый стероидный ре-

цептор имеет два функциональных домена: домен, связывающий гормон, и домен прочного связывания ДНК энхансера. Присоединение гормона к первому домену, по-видимому, необходимо для того, чтобы второй домен связался со специфической последовательностью ДНК (Kumar et al., 1986, 1987). ДНК-связывающие домены этих белков очень похожи, но могут различать незначительные изменения в последовательности ДНК. Например, последовательность (палиндромная) 5'-ГГТЦАЦТГТГАЦЦ-3' является сильным эстроген-чувствительным энхансерным элементом, который будет связывать рецептор с присоединенным эстрогеном. Две симметричные мутации в этой последовательности, приводящие к 5'-ГГАЦАЦТГТГТЦЦ-3', будут превращать эту ДНК в глюкокортикоид-чувствительный энхансер (Martinez et al., 1987; Klock et al., 1987). Весьма вероятно, что все стероидные гормоны осуществляют активацию транскрипции по одному общему механизму.

Транскрипция генов легких цепей иммуноглобулинов

Один из наиболее хорошо изученных случаев регуляции генов на уровне транскрипции относится к иммуноглобулиновым генам мыши. За последние пять лет были идентифицированы *цис*- и *транс*-регуляторные элементы, необходимые для специфической транскрипции этих генов в В-клетках.

Делеционное картирование клонированных генов показало, что промотор легкой цепи иммуноглобулина имеет два критических участка — ТАТА-бокс и передний элемент, называемый «окта»-боксом (Bergman et al., 1984; Parslow et al., 1984). Окта-бокс, названный так потому, что состоит из 8 пар оснований, прочитывается как АТТТГЦАТ. Он был обнаружен во всех изученных промоторах легких цепей иммуноглобулинов и в очень незначительном числе других сайтов. Промоторы генов тяжелых цепей иммуноглобулинов имеют «инвертированный» окта-бокс, АТГЦАААТ (рис. 12.15). Если окта-бокс помещают с 5'-стороны от глобинового гена, то транскрипция этого гена в клетке миеломы увеличивается в 11–18 раз. Это увеличение наблюдалось только в лимфоидных клетках и не наблюдалось в фибробластах (Wirth et al., 1987).

Последовательность энхансера генов легких цепей иммуноглобулинов расположена внутри первого интрона между последовательностью VJ и последовательностью константной области (Queen, Baltimore, 1983; Bergman et al., 1984). Если эту последовательность транслировать на клонированные глобиновые гены, то эти гены также приобретают способность специфически транскрибироваться в лимфоцитах (Picard, Schaffner, 1984).

Гены легких цепей мыши

		Окта-бокс		Расстояние от АТГ
		{		
	ТГЦТАГАЦТГТАЦТТГЦГ	АТТТГЦАТ	АТТАЦАТТТТЦАГТААЦЦАЦАА	107
K2	ГЦТГГГССТАЦЦТТТГЦТГ	АТТТГЦАТ	ГТАЦЦААААГЦАТАГЦТТАЦТГ	100
M1738	АТЦЦТАААЦГТТЦТТААТГ	АТТТГЦАТ	АТЦЦТЦАЦТАЦАТЦГЦЦТТГГ	91
M41	АТЦЦТАААЦГТЦТЦТТАТА	АТТТГЦАТ	АЦЦЦТЦАЦТГЦАТЦГЦЦТТГГ	92
M167	----ЦАГЦАЦТГАЦЦААТГГ	АТТТГЦАТ	ААТГЦТЦЦЦТАГГГТЦЦАЦТТЦ	106
T1	ГЦААТААЦТГГТТЦЦААТГ	АТТТГЦАТ	ГЦТЦТЦАЦТТЦАЦТГЦЦТТГГ	97
T2	АГЦААЦАТГААГАЦАГТАТГ	АТТТГЦАТ	ААГТТТТЦТТТЦТТЦААТГТ	109
K21C	АААЦАГТАЦАТАЦТЦГЦТГ	АТТТГЦАТ	АТГАААТААТТТТАААЦАГЦЦ	93
M11	АЦТТЦЦТТАТТТГАТГАЦТС	АТТТГЦАТ	АГАТЦЦЦТАГАГГЦЦАГЦАЦАГ	73
λ_1	ТАААЦЦТГТАААТГАААГТА	АТТТГЦАТ	ТАЦТАГЦЦЦАГЦЦЦАГЦЦАТА	106
λ_{II}	ТАААЦЦТГТАААТГАААГТА	АТТТГЦАТ	ТАЦТАГЦЦЦАГЦЦЦАГЦЦАТА	105

Гены легких цепей человека

h101	ГЦЦТГЦЦЦЦАТЦЦЦЦТГЦТЦ	АТТТГЦАТ	ГТТЦЦЦАГАГЦАЦААЦЦТЦТГ	96
h122	ГЦЦТГЦЦЦЦАТЦЦЦЦТГЦТГ	АТТТГЦЦТ	ГТТЦЦТАГАГЦАЦАГЦЦЦЦТГ	102
h100	ТЦАТТЦТТГЦАТЦТГТТГАА	АТТТГЦАТ	ТТТЦАААААААЦАЦАГЦЦААЦТ	96

Гены тяжелых цепей

V _H 167	ТААТГАТАТАГЦАГАААГАЦ	АТГЦАААТ	ТАГГЦЦАЦЦЦТЦАТЦАЦАТГАА	118
V _H 105	ГТААТГЦАЦТГЦТЦАТГААТ	АТГЦАААТ	ЦАЦЦТГГГТЦАТГГЦАГТААА	114
V _H 111	ГТААТГЦАЦТГЦТЦАТГААТ	АТГЦАААТ	ЦАЦГЦААГТЦТТТГГЦАГТААА	108
V _H 104	ГААГТАЦЦЦТГЦТЦАТГААТ	АТГААААТ	ТАЦЦЦААГТЦАТГГТАГТААА	108
V _H 108	АААГТЦЦЦЦТГЦТЦАТГААТ	АТГААААТ	ТАЦЦГТТЦТЦАТГТТГГТТАА	109
V _H 101	ТЦТЦТЦАГГААЦЦТЦЦЦЦА	АТГААААГ	ЦАГЦЦЦТЦАГГЦАГАГГАТААА	85



При созревании лимфоцитов в ходе перестроек генов происходит сближение энхансеров и промоторов. Количество ядерных транскриптов с перестроенных генов легких цепей (имеющих сближенные промотор и энхансер) более чем в 16 000 раз превышает количество транскриптов с генов, которые не перестроены (Mather, Perry, 1982). При этом энхансер легких цепей иммуноглобулинов стимулирует свои собственные промоторы в 20 раз эффективнее, чем промоторы вируса SV40 или гена металлотионеина. Это наблюдение предполагает синергизм в специфическом взаимодействии между обоими элементами (Garcia et al., 1986). Перестройки сами по себе еще не обеспечивают активацию генов, поскольку перестроенный ген иммуноглобулина не транскрибируется после введения его в фибробласт или в клетку печени. Для начала его транскрипции необходимо присутствие специфических для клетки транс-регуляторных факторов.

Рис. 12.15. Присутствие эволюционно консервативных окта-боксов в промоторах генов иммуноглобулинов. Окта-бокс тяжелых цепей представляет собой инвертированную форму октамера легких цепей (читать А вместо Т, Ц вместо Г и т.д. в обратном направлении). Правая колонка чисел указывает расстояние от конца окта-бокса до начала первого экзона. (Из Parslow et al., 1984.)

В 1986 г. были идентифицированы два фактора, связывающиеся с промотором (Staudt et al., 1986). С целью идентификации небольшой фрагмент ДНК, содержащий окта-бокс, инкубировали в ядерных экстрактах из различных клеток. Затем полученные продукты фракционировали в геле. Если ядерный экстракт не содержал белка, связывающегося с этой ДНК, то небольшой фрагмент ДНК быстро двигался через гель. Однако если какой-либо белок действительно присоединялся к этой ДНК, то ее миграция через гель затруднялась. Этот опыт по сдвигу подвижности (рис. 12.16) показал, что каждое ядро содержит по крайней мере один фактор, способный присоединяться к данному фрагменту ДНК. Кроме того, клетки В-ряда (пре-В-клетки, В-клетки и плазматические клетки) дополнительно содержат еще один фактор, специфически связывающийся с ДНК окта-бокса. Эти ДНК-связывающие белки были изолированы, и белок, специфический

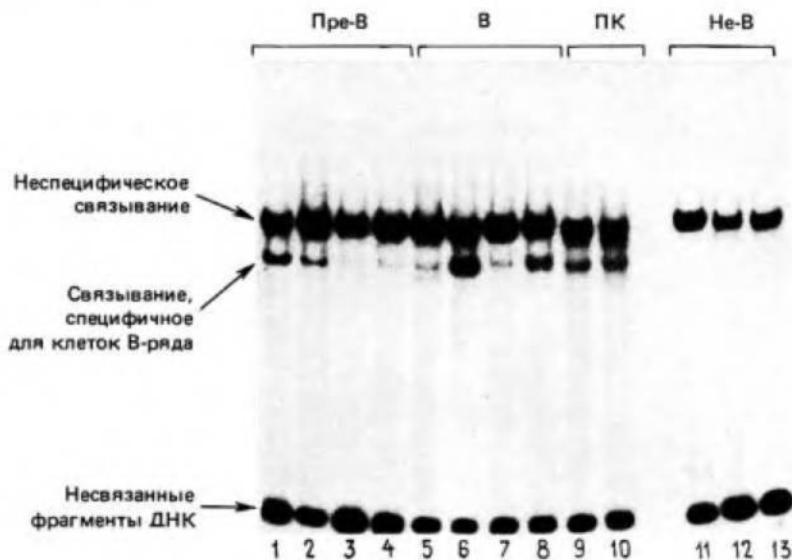


Рис. 12.16. Определение сдвига электрофоретической подвижности. Ядерные экстракты из клеток В-ряда (пре-В, В и плазматические (ПК) клетки) и из клеток, не относящихся к В-ряду (цервикальные, фибробласты и клеточные линии предшественников эритроцитов), смешивали с небольшим сегментом ДНК, содержащим октамер. После инкубации смесь фракционировали с помощью электрофореза в геле, переносили на нитроцеллюлозный фильтр и гибридизовали с радиоактивной ДНК, комплементарной к последовательности октамера. Если фрагменты, содержащие октамер, остаются несвязанными, то они быстро движутся к концу геля. Во всех ядрах имеется белок, связывающийся с октамером неспецифично и существенно замедляющий миграцию. Помимо этого в ядрах из клеток В-ряда содержится другой белок, который затрудняет миграцию из-за присоединения к последовательности октамера. (Из Staudt et al., 1986; фотография с любезного разрешения D. Baltimore.)

для лимфоцитов, был назван NF-A2. Аналогичные методы были использованы для поиска ядерного белка, характерного для клеток В-ряда и специфически связывающегося с энхансерными последовательностями генов легких цепей иммуноглобулинов (Sen, Baltimore, 1986a; Atchinson, Perry, 1987). Этот белок, обозначенный как NF-κB, обнаруживается только в зрелых В-клетках и плазматических клетках, т. е. в единственных известных клетках, синтезирующих иммуноглобулины¹. Активный NF-κB не обнаружен в клетках какого-либо другого типа (в том числе и в пре-В-клетках), а также в линии плазматических клеток, которые утратили способность синтезировать легкую цепь иммуноглобулинов. Активный белок NF-κB появляется тогда, когда пре-В-клетки индуцируются к образованию В-клеток.

Эти наблюдения поднимают проблему дифференциальной активности генов на другой уровень:

¹ В пре-В-клетке синтезируется только тяжелая цепь иммуноглобулинов и не синтезируется легкая. Вызывает удивление присутствие неспецифического белка, связывающегося с окта-боксом, в клетках, не относящихся к В-ряду. Оказалось, что ген гистона H2B имеет в своем энхансере окта-бокс, и присоединение неспецифического белка, связывающегося с окта-боксом, определяет время его экспрессии, благодаря чему этот ген транскрибируется в течение S-фазы клеточного цикла (Roeder, 1987; Fletcher et al., 1987).

что именно контролирует синтез специфических для В-клеток белков — промоторсвязывающего белка NF-A2 и энхансерсвязывающего белка NF-κB? (Иными словами, чтобы объяснить, как осуществляется специфический для клеток синтез иммуноглобулинов, мы должны теперь объяснить, как эти два ядерных белка синтезируются специфическим для клеток образом.) Оказалось, что белок NF-κB в неактивной форме содержится в клетках многих типов, но модифицироваться в активную форму он может только в В-клетках. Когда пре-В-клетки искусственно стимулируются к образованию В-клеток, активный NF-κB появляется даже в отсутствие белкового синтеза (Sen, Baltimore, 1986b). Природа модификации этого белка остается неизвестной.

Анализ специфической для клеток транскрипции генов легких цепей иммуноглобулинов вышел в итоге за уровень исследования продуктов терминальной дифференцировки клеток. Мы знаем, что транскрипция этого иммуноглобулинового гена зависит от исходной активности двух ядерных белков, NF-A2 и NF-κB, которая наблюдается только в клетках В-ряда. Остается выяснить, каким образом вызывается дифференциальная экспрессия этих двух генов в развивающемся лимфоците.

Исследование иммуноглобулинового энхансера дало объяснение и другим биологическим явлениям. Ниже (т. 3, гл. 20) мы обсудим вопрос о том, что

лимфоцитарные опухоли возникают, когда обычный ген фактора роста переносится в область иммуноглобулинового энхансера, благодаря чему ген фактора роста транскрибируется по времени и по количеству как антитела. Кроме того, быстрое размножение вируса СПИДа, HIV-1, объясняется тем,

что он имеет энхансер, очень похожий на энхансер легких цепей иммуноглобулинов. Когда этот вирус инфицирует Т-лимфоцит, он способен индуцировать образование активного NF-κB (Sen, Baltimore, 1986b).

Дополнительные сведения и гипотезы

Модульные гены

В 1978 г. Уолтер Гилберт предложил радикальную гипотезу для объяснения существования интронов. Он предположил, что эукариотический геном состоит из модульных единиц, что позволяет «смешивать и сочетать» части. Экзоны кодируют функциональные домены белков и могут сортироваться в ходе эволюции независимо. В 1979 г. начали появляться первые данные в пользу этой гипотезы. Структура тяжелой γ -цепи иммуноглобулина состоит из пяти доменов, каждый из которых имеет специфическую функцию. Домен CH3 участвует во взаимодействиях поверхностей клеток, домен CH2 присоединяет молекулы комплемента, шарнирный домен позволяет изгибаться антигенсвязывающим сайтам, домен CH1 присоединяется к легкой цепи, а домен варибельной области формирует антигенсвязывающий сайт. Каждый из этих доменов кодируется отдельным экзоном (рис. 12.17) (Sakano et al., 1979). Функциональные домены ряда белков, в том числе глобинов, кристаллинов хрусталика и белков клеточного узнавания большого комплекса тканевой совместимости, также отражают расположение своих экзонов (Inana et al., 1983; Gilbert, 1985).

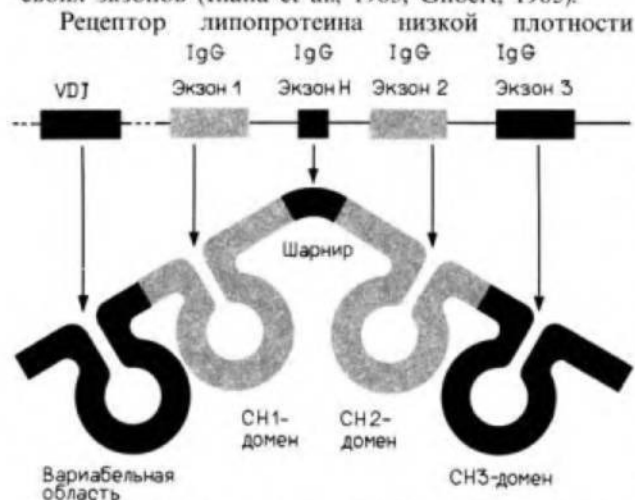


Рис. 12.17. Соотношение между экзонами гена и доменами глобулярного белка для тяжелой цепи IgG. Каждый домен белка кодируется отдельным экзоном. (Данные из Sakano et al., 1979.)

(ЛНП) предоставил первое свидетельство **перемешивания экзонов**, которое предполагает, что экзоны могут дуплицироваться в одном гене и затем рекрутироваться для использования в другом гене. Ген этого белка был секвенирован (что оказалось непростым делом, так как он содержит 18 экзонов), и было проведено сравнение его последовательности с другими генами и с функциональными доменами ЛНП-рецептора (Südhof et al., 1985). Оказалось, что участок из 400 аминокислот в ЛНП-рецепторе кодируется восемью соседними экзонами, которые очень похожи на восемь экзонов гена фактора роста эпидермиса. В этом же гене был обнаружен еще один домен ЛНП-рецептора размером в 40 аминокислот. Помимо этого ген ЛНП-рецептора содержит серию экзонов, общих с геном белка C9 комплемента (рис. 12.18). Таким образом, ген ЛНП-рецептора оказывается мозаикой из экзонов, полученных из нескольких различных источников.

Если экзоны могут быть перемещены в новые гены, не могут ли быть перемещены также и энхансеры? Вопрос этот крайне важен, поскольку многие эволюционные события можно было бы объяснить изменением времени или места экспрессии генов. Эта гипотеза проверялась на гавайских видах дрозофилы (Rabinow, Dickinson, 1986). Видообразование у этих мух идет с исключительно высокой скоростью, и несколько видов обнаруживают различия в тканевой специфичности экспрессии генов. Например, у личинки *D. hawaiiensis* ген алкогольдегидрогеназы (АДГ) экспрессируется в жировых телах и каркасе, тогда как у личинки *D. formella* ген алкогольдегидрогеназы экспрессируется только в жировых телах. Оба фермента можно различить с помощью электрофореза. Эти виды можно спарить друг с другом и получить гибридные личинки. Когда были исследованы жировые тела этих личинок, в них были обнаружены оба фермента АДГ – специфичный для *D. hawaiiensis* и специфичный для *D. formella*. Однако при анализе каркаса был обнаружен белок только из *D. hawaiiensis*. Такое распределение можно ожидать, если гены АДГ контролируются *цис*-регуляторными элементами, которые различаются у этих двух близкородственных видов. (Если бы экс-

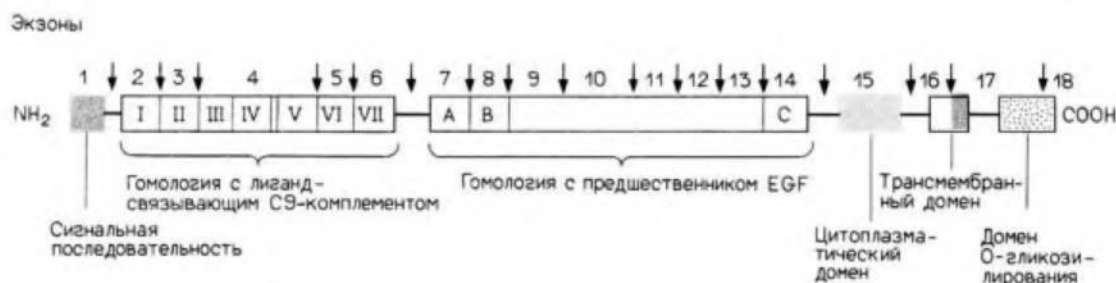


Рис. 12.18. Модульная структура доменов рецептора ЛНП. Шесть доменов белка показаны в виде прямоугольников, кодирующие их экзоны обозначены цифрами между стрелками над картой белка. Области, гомологичные другим группам экзонов, указаны под картой. (Из Südhof et al., 1985.)

прессия определялась *транс*-регуляторными элементами, то оба гена были бы либо включены, либо выключены.) Это наблюдение свидетельствует о

том, что энхансеры могут меняться в ходе эволюции, благодаря чему в различных тканях будут синтезироваться различные продукты.

Метилирование ДНК

Нередко полагают, что ген состоит из одних и тех же нуклеотидов, когда он активен и когда он неактивен. Ген β -цепи глобина в предшественнике эритроцитов должен иметь те же нуклеотиды, что и ген β -цепи глобина в фибробласте того же организма. В 1948 г. в ДНК было открыто «пятое основание» — 5-метилцитозин (Hotchkiss, 1948). Это основание образуется ферментативным путем после репликации ДНК, и около 5% цитозинов в ДНК млекопитающих переводится в 5-метилцитозин. Эта конверсия может происходить только в том случае, когда за цитидиновым остатком следует гуанозин (ЦфГ). Недавние исследования показали, что степень метилирования цитозинов в гене может контролировать его транскрипцию. Другими словами, **метилирование ДНК** может менять структуру гена и благодаря этому регулировать его активность.

Первые данные о том, что метилирование ДНК помогает регулировать активность генов, были получены в исследованиях, показавших корреляцию между активностью гена и его метилированием (гипометилированием), особенно в области промотора гена. В развивающихся эритроцитах человека и курицы ДНК, участвующая в синтезе глобинов, полностью или почти полностью неметилирована, тогда как те же гены в клетках, которые не синтезируют глобины, метилированы в высокой степени (рис. 12.19, А). Клетки печени плода, которые синтезируют гемоглобин на ранних стадиях развития, имеют неметилированные гены для фетального гемоглобина. Эти гены становятся метилированными в тканях взрослого организма (van der Ploeg, Flavell, 1980; Groudine, Weintraub, 1981).

Специфическое для органа метилирование наб-

людается также в гене овальбумина курицы; этот ген не метилирован в клетках яйцевода, но метилирован в других тканях курицы (Mandel, Chambon, 1979). Деметилирование сопровождается переключением классов при синтезе иммуноглобулинов (Rogers, Wall, 1981) и коррелирует со способностью грызунов продуцировать металлсвязывающий белок металлотронеин I (Compere, Palmiter, 1981). Таким образом, отсутствие метилирования ДНК хорошо коррелирует с тканеспецифической экспрессией определенных генов.

Вторая группа данных, свидетельствующих о том, что метилирование ДНК является регуляторным процессом, получена в опытах, где экспрессию клонированных генов изменяли с помощью введения или удаления метильных групп из остатков цитозина. Один из таких опытов еще раз подтвердил, что гипометилирование необходимо для транскрипции β -глобинового гена человека (Busslinger et al., 1983). Когда глобиновые гены клонировали и добавили к клеткам с помощью пересадки с фосфатом кальция, клетки захватывали ДНК и нередко включали эту ДНК в ядра. В таких случаях клонированный глобиновый ген транскрибировался. С помощью защиты от метилирования определенных участков клонированных генов перед их добавлением к клеткам можно получить клоны, в которых глобиновые гены имеют идентичные последовательности, но разный характер метилирования (рис. 12.19, Б). Полностью неметилированный ген транскрибировался, тогда как полностью метилированный ген (метильная группа на каждом подходящем остатке Ц) не транскрибировался. С использованием частично метилированных клонов было показано, что метилирование в 5'-области глобинового гена (нуклеотиды от -760 до +100) предотвращает транскрипцию. Таким образом, метилирова-

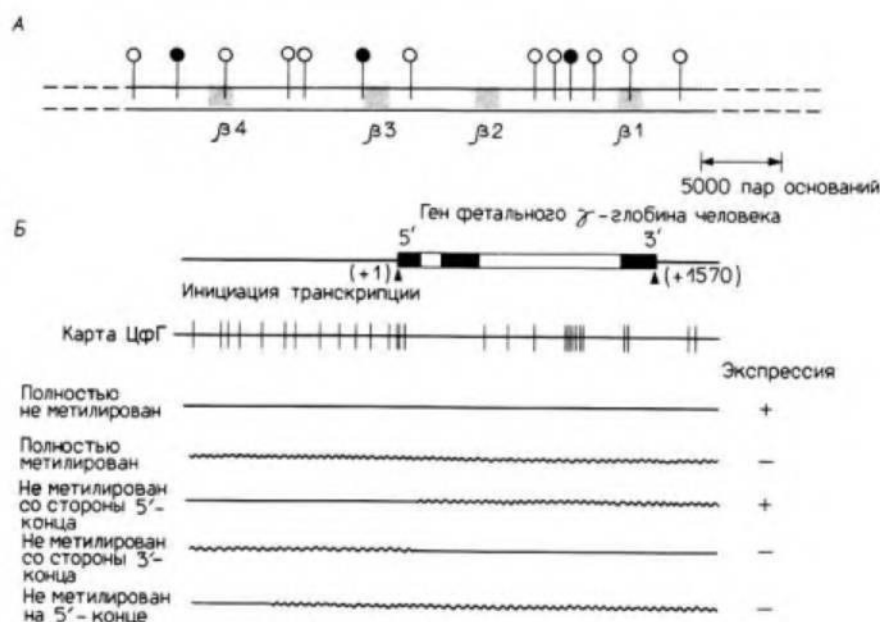


Рис. 12.19. Схема метилирования глобиновых генов. А. Метилирование β -цепей глобина кролика ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$). Каждый ген этого кластера представлен серым квадратом. Последовательности ЦФГ обозначены кружками, причем черными кружками обозначены те из них, которые полностью метилированы только в клетках, не транскрибирующих глобины. Б. Метилирование контролирует транскрипцию клонированного гена фетального γ -глобина человека. На верхней диаграмме показаны клонированный глобиновый ген и его 5'- и 3'-фланкирующие области. Экзоны обозначены черным цветом, интроны – белым, фланкирующие области – тонкими линиями. Под диаграммой представлена карта возможных сайтов метилирования ДНК, которые представляют собой участки, где присутствует динуклеотид ЦФГ. Под этой картой приведены схемы метилирования пяти клонов, которые были изучены в данной работе. Прямыми линиями изображены неметилированные сегменты, волнистыми – метилированные. Знаки + и – с правой стороны рисунка указывают на то, экспрессировались или не экспрессировались данные сегменты. (А – по Shen, Maniatis, 1980; Б – по Busslinger et al., 1983.)

ние на 5'-конце гена играет, по-видимому, главную роль в регуляции экспрессии генов.

Третья группа данных получена в экспериментах, в которых изначально неактивные гены активировались при их деметилировании непосредственно внутри ядер. Была получена корреляция между активацией молчащих генов и утратой метильных групп из их цитозинов. Из гл. 10 мы узнали, что неактивные гены, специфичные для печени, могут быть активированы в фибробластах мыши после слияния этих фибробластов с клетками печени. Эта активация сопровождается деметилированием генов, специфических для печени особенно в их 5'-областях (Sellem et al., 1985). Когда 5'-области этих генов деметилированы, они похожи на активные гены, специфические для печени, и активно транскрибируют РНК.

Другой метод деметилирования генов заключается в обработке клеток препаратом **5-азацитидином**. Полагают, что это соединение ингибирует метилтрансферазу, что приводит к деметилированию той ДНК, которая обычно является метилированной (Razin et al., 1984). Когда 5-азацитидин добавляли к колониям мышинных фибробластов СЗН10Т1/2, эти клетки с высокой частотой превращались в мио-

циты, адипоциты или хондроциты (Taylor, Jones, 1982; Konieczny, Emerson, 1984). Полученные фенотипы были стабильны, на основании чего можно предположить, что характер метилирования передается через многие циклы клеточных делений. Было показано, что ДНК из миобластов, полученных из обработанных 5-азацитидином клеток СЗН10Т1/2, способна превращать другие клетки СЗН10Т1/2 в миобласты, тогда как ДНК из необработанных клеток СЗН10Т1/2 не обладает этой способностью (Lassar et al., 1986).

Четвертая группа данных, свидетельствующих о регуляции транскрипции с помощью метилирования ДНК, получена в исследованиях инактивации Х-хромосомы у млекопитающих. В этом случае метилирование ДНК играет главную роль в поддержании неактивного состояния одной из двух Х-хромосом в каждой клетке. Предположение о существовании определенных различий в ДНК хромосом впервые возникло на основе данных, полученных в опытах по трансфекции гена гипоксантинфосфорибозилтрансферазы (ГФРТ), связанного с Х-хромосомой, в мышинные клетки фенотипа ГФРТ⁻ (Liskay, Evans, 1980). Когда использовали клон клеток, в которых ген находился на неактивной Х-хромосоме, получен-

ная ДНК была неспособна вызвать синтез фермента в клетке-хозяине ГФРТ⁻. Когда ДНК получали из клона клеток, имеющих ген ГФРТ на активной X-хромосоме, в трансформированных клетках фермент синтезировался.

Годом позже было получено еще одно подтверждение того, что метилирование играет в инактивации X-хромосомы определенную роль; тогда было обнаружено, что 5-азацитидин локально реактивирует гены на неактивной X-хромосоме. Группа исследователей сконструировала гибридные клетки, в которых были активная X-хромосома *мыши* и неактивная X-хромосома *человека* (Mohandas et al., 1981). После обработки 5-азацитидином были обнаружены клоны клеток, которые синтезировали фермент ГФРТ с X-хромосомы человека.

И наконец, оказалось, что некоторые конститутивные ферменты, кодируемые X-хромосомой (т.е. те ферменты, которые должны присутствовать в каждой клетке, а не только в специализированных), имеют на 5'-концах своих генов кластеры из ЦГ-богатых участков. В активной X-хромосоме по крайней мере у трех генов 5'-кластеры гипометилированы, тогда как эти же кластеры в аналогичных генах на неактивной X-хромосоме интенсивно метилированы (Wolf et al., 1982; Keith et al., 1986). Сходным образом группы ЦГ на 3'-концах генов более метилированы в неактивной X-хромосоме, чем в активной. Когда X-хромосома реактивируется (естественным образом, как в ворсинках хориона или в опыте с 5-азацитидином), эти кластеры становятся гипометилированными¹ (Wolf et al., 1984). Помимо этого, когда клетки тератокарциномы дифференцируются и одна из X-хромосом инактивируется, ЦГ-кластеры на этих генах становятся метилированными (Lock et al., 1987). Хотя инициатор инактивации X-хромосомы до сих пор неизвестен, весьма вероятно, что метилирование ДНК поддерживает неактивное состояние X-хромо-



Рис. 12.20. Модель передачи характера метилирования дочерним молекулам. В ходе репликации исходный тип метилирования сохраняется лишь в одной из двух цепей ДНК (в «старой»). Другая цепь («новая») не метилирована. Фермент метилирования, специфичный к ЦГ, может присоединяться к тем ЦГ-парам, где остаток Ц метилирован, и затем метилировать остаток Ц на комплементарной цепи. (По Browder, 1984.)

сомы и передает его от одного поколения клеток к другому (Kaslow, Migeon, 1987).

Если предложенная гипотеза о деметилировании справедлива, то распределение метилированных и деметилированных цитозинов должно устойчиво наследоваться на протяжении многих клеточных делений и «стираться» в половых клетках. Так в действительности и происходит. Установленный в клетках специфический характер метилирования стабилен на протяжении более 100 клеточных делений (Wigler et al., 1981; Stein et al., 1982). Предложен механизм для передачи этого распределения (Stein et al., 1982). Когда исследователи трансфицировали клетку гемиметилированной ДНК (т.е. ДНК, в которой только одна цепь метилирована), то метилирование ЦГ было обнаружено у всего клонального потомства этой клетки после многих клеточных делений. Предположили, что ЦГ-специфический метилирующий фермент использует метилированные цитидины как матрицу для метилирования цитидинов на компле-

¹ Большая часть изученных к настоящему времени генов, зависящих от РНК-полимеразы II, являются генами, продукты которых (например, гемоглобин, овальбумин и коллаген) характеризуют клетку определенного типа. Это вызвано тем, что такие гены производят необычно большое количество конкретных мРНК, которые могут быть легко изолированы и затем использованы как зонды для клонированных генов. Эти гены регулируются в развитии так, что их экспрессия происходит в специфических типах клеток в определенные периоды времени. Те гены, которые не регулируются в развитии (их продукты присутствуют в большинстве клеток на всех стадиях), могут контролироваться другим образом и иметь другую структуру. Для таких генов не нужны последовательности ТАТА или СААТ (Melton et al., 1986; Reynolds et al., 1984). Они, по-видимому, должны иметь кластеры ЦГ вблизи 5'-концов. Эти кластеры обычно гипометилированы и находятся в участках, гиперчувствительных к ДНКазе I (Wolf, Migeon, 1984).

ментарной цепи (рис. 12.20). Это объясняет также, почему за метилированными цитидинами всегда следуют гуанозины.

В развивающихся спермиях не наблюдается ни одно из распределений гипометилирования, характерных для соматических клеток. Все специфические для клеток гены (глобинов, овальбумина, иммуноглобулинов и т.д.) являются высокометилированными. Большая часть гипометилированных сайтов, обнаруженных до сих пор в сперматогониях (предшественниках спермиев), оказываются метилированными в зрелых спермиях. По разнице в метилировании генов спермия и яйца можно определить, получен ли ген от отца или от матери. Если ядра первичных половых клеток и у самцов, и у самок резко гипометилированы (Monk et al., 1987), то гены спермия и яйца интенсивно метилированы. Кроме того, характер метилирования данного гена в яйце и спермии может различаться (Reik et al., 1987; Sapienza et al., 1987). Этот материнский и отцовский **импринтинг** добавляет информацию к наследуемым геномам — информацию, которая может регулировать активность генов и поведение хромосом в пространстве и во времени. В эксперименте была получена линия трансгенных мышей, у которых в геном был встроен ген, индуцирующий образо-

вание опухоли (этот процесс будет рассмотрен в гл. 20) (Swain et al., 1987). Если этот ген был унаследован от самца, то он транскрибировался исключительно в сердце, но ни в какой другой ткани. В случае если этот ген наследовался от самки, он не экспрессировался вовсе. Этот характер экспрессии коррелировал со степенью метилирования. Рассматриваемый ген метилировался в ходе созревания яйца и деметилировался при образовании спермия. Такая специфичная для гамет разница в метилировании дает правдоподобное объяснение неспособности к развитию партеногенетических млекопитающих и необходимости присутствия в зиготе обоих пронуклеусов — отцовского и материнского.

Очевидно, что метилирование является важным механизмом регуляции активности генов, но оно не может применяться для всех генов. По-видимому, этот процесс широко распространен среди позвоночных, но даже у них некоторые гены сохраняют способность к транскрипции, хотя и являются метилированными (Gerber-Huber et al., 1983). Кроме того, метилирования ДНК не происходит, очевидно, у дрозофилы, где тканеспецифическая транскрипция генов хорошо документирована.

Дополнительные сведения и гипотезы

Определение сайтов метилирования

Когда происходит метилирование ДНК, оно практически всегда идет по цитидину из ЦфГ-пары. Распределение этих метилированных и неметилированных ЦГ-дуплетов определяется с помощью разрезания ДНК двумя рестриктазами, *HpaII* и *MspI* (McGhee, Ginder, 1979). Оба этих фермента разрезают в одном сайте, ЦЦГГ, но *HpaII* не будет разрезать ДНК, если метилирован центральный Ц, тогда как *MspI* будет разрезать эту последовательность независимо от того, метилирована она или нет. Следовательно, ДНК из клеток определенного типа может быть гидролизована *HpaII* и отдельно *MspI*; затем фрагменты расщепленной ДНК могут быть разделены с помощью электрофореза в геле, перенесены на нитроцеллюлозный фильтр и гибридизованы с радиоактивным зондом, специфичным для исследуемого гена. Разницу в распределении зон на радиоавтографах для фрагментов, полученных с *MspI* и с *HpaII*, можно объяснить разницей в метилировании.

На рис. 12.21 показан результат одного из экспериментов с выделением ДНК спермиев и ее обработкой *HpaII* и *MspI*. Зондом являлась радиоактивная ДНК из второго экзона β -глобинового гена. Радиоавтограф фрагментов *MspI*-гидролизата



Рис. 12.21. Обнаружение сайтов метилирования в ДНК. ДНК выделяли из спермы петуха и гидролизовали рестриктазой *MspI* (дорожка 1) или *HpaII* (дорожка 2). Фрагменты разделяли с помощью электрофореза, переносили на фильтр и гибридизовали с радиоактивным ДНК-зондом из второго экзона β -глобинового гена. Этот зонд связывался с фрагментом длиной 1400 нуклеотидов в *MspI*-гидролизате и с фрагментом длиной примерно 25 000 нуклеотидов в *HpaII*-гидролизате. (Из Groudine, Conklin, 1985; фотография с любезного разрешения M. Groudine.)

показывает, что этот зонд присоединяется к фрагментам ДНК, у которой ЦЦГГ-сайты лежат друг от друга на расстоянии 1400 пар оснований. Радиоавтограф с *HpaII*-гидролизатом показывает, что в ДНК спермиев эти сайты метилированы и что

исследуемая последовательность ДНК лежит на отрезке ДНК длиной 25 000 пар оснований, на котором все ЦЦГГ-сайты метилированы (Groudine, Conklin, 1985).

ХРОМАТИН ЭУКАРИОТ

Нуклеосомы

До сих пор при рассмотрении транскрипции мРНК мы ограничивались структурой самих генов. Но внутри ядра гены не существуют в «голом» виде, легко доступные для РНК-полимеразы или какого-либо другого белка, связывающегося с энхансером или промотором. Напротив, эукариотические хромосомы содержат столько же белка (по массе), сколько нуклеиновой кислоты, и этот ДНК-белковый комплекс называют **хроматином**. Доминирующими белками хроматина являются **гистоны**. Эти пять белков — H1, H2A, H2B, H3 и H4 — представляют собой сильноосновные полипептиды с высоким содержанием положительно заряженных аминокислот лизина и аргинина. Другой гистон, H5, обнаружен в клетках немногих типов (а именно в эритроцитах птиц и амфибий), в которых ДНК упакована предельно плотно. В этих клетках H5 заменяет H1.

Пять перечисленных главных гистонов имеются у всех представителей царств животных, растений и простейших и в ходе эволюции изменились очень мало. Обычно такой консерватизм означает, что белки должны играть исключительно важную роль во всех изученных клетках. Ключевая функция гистонов заключается в упаковке ДНК в специфические спиральные структуры, называемые **нуклеосомами**. Нуклеосома — это основная единица структуры хроматина; она состоит из гистонового октамера (H2A, H2B, H3, H4)₂, вокруг которого намотано два витка ДНК, составляющих примерно 140 пар оснований (рис. 12.22). Между нуклеосомами лежат другие 60 (или около того) пар оснований ДНК; эти «линкерные» нуклеотиды могут быть покрыты гистоном H1. Такая структура предполагается на основе опытов по расщеплению хроматина, когда он подвергается гидролизу небольшими количествами дезоксирибонуклеазы (ДНКазы) из определенных бактерий (*Micrococcus*). Эта обработка приводит к расщеплению ДНК по некоторым сайтам, и полученные фрагменты хроматина могут быть отделены друг от друга с помощью центрифугирования в градиенте плотности сахарозы (рис. 12.23). Когда ДНК экстрагируют из обработанного хроматина и разделяют в гелях, получается четкая картина. Вместо кусков случайного размера ДНК предстает расщепленной на фрагменты, кратные по длине 200

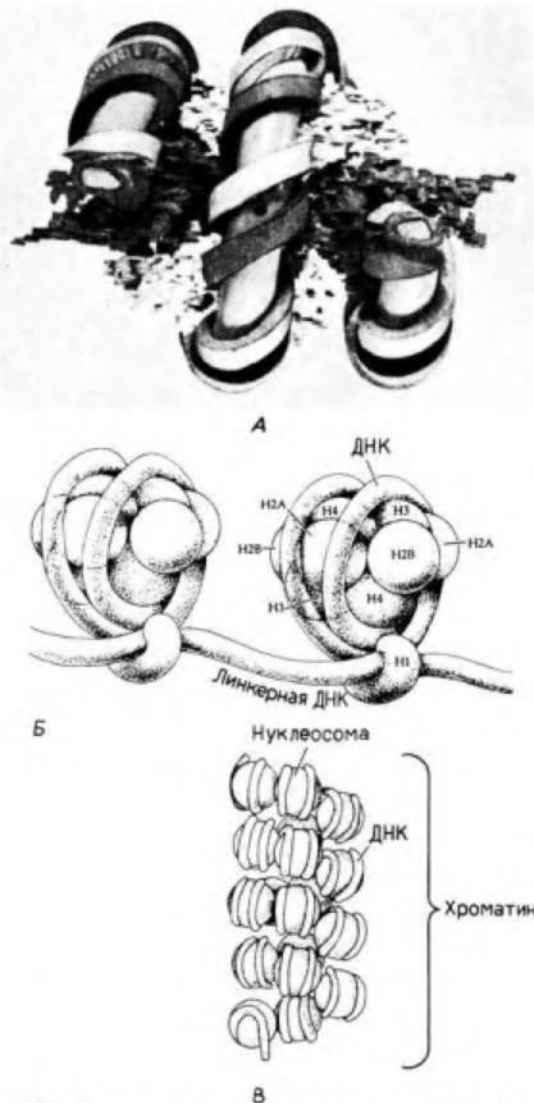


Рис. 12.22. Строение нуклеосомы и хроматина. А. Модель нуклеосомы с разрешением 0,33 нм по данным рентгеноструктурного анализа. Центральная двояковогнутая белковая единица (белая) представляет собой тетрамер H3–H4. Каждая из темных яйцевидных структур по бокам от тетрамера является димером H2A–H2B. Модель построена для хроматина из эритроцитов курицы. Б. Модель нуклеосомы. Приблизительно 140 пар оснований ДНК накручены на октамер гистонов (включающий гистоны H2A, H2B, H3 и H4), и около 60 пар оснований связывают нуклеосомы друг с другом. В. Модель укладки нуклеосом в компактную, напоминающую соленоид структуру хроматина. (А — из Burlingame et al., 1985; В — по Stewart, Hunt, 1982.)

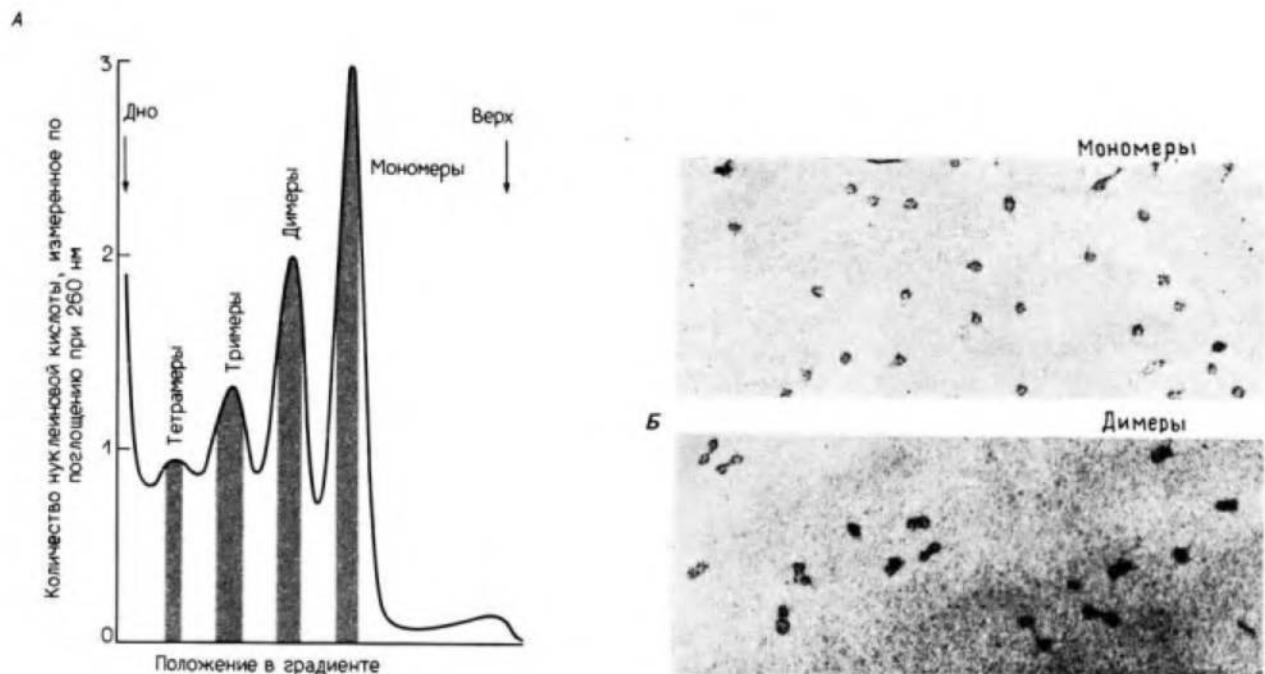


Рис. 12.23. Характеристика мультимеров нуклеосом. А. Разделение дискретных групп частиц, полученных после обработки микрококковой нуклеазой хроматина из печени крысы при центрифугировании в градиенте плотности сахарозы. Б. Электронные микрофотографии частиц из фракций, соответствующих четырем пикам в градиенте сахарозы: видны мономеры, димеры, тримеры и тетрамеры нуклеосом. В. Из фракций, соответствующих каждому пику

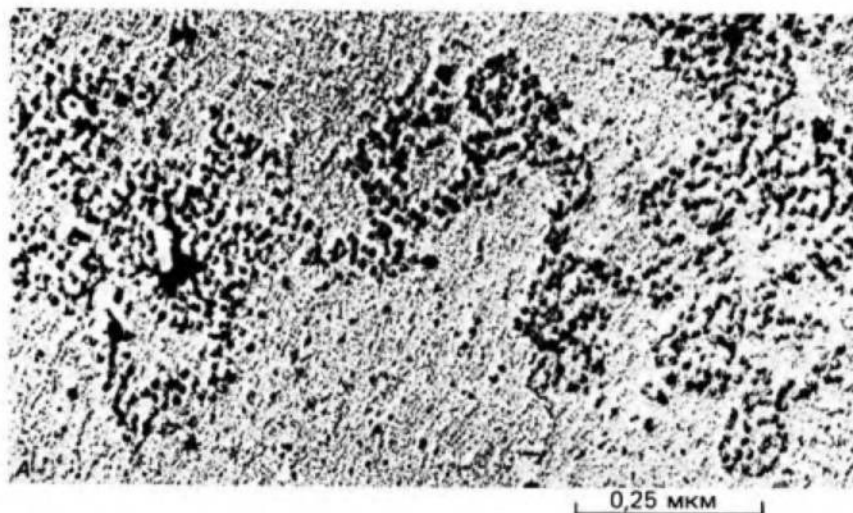
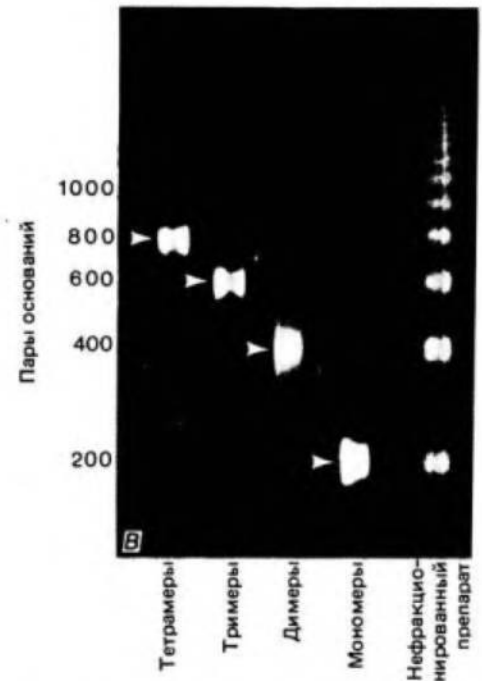
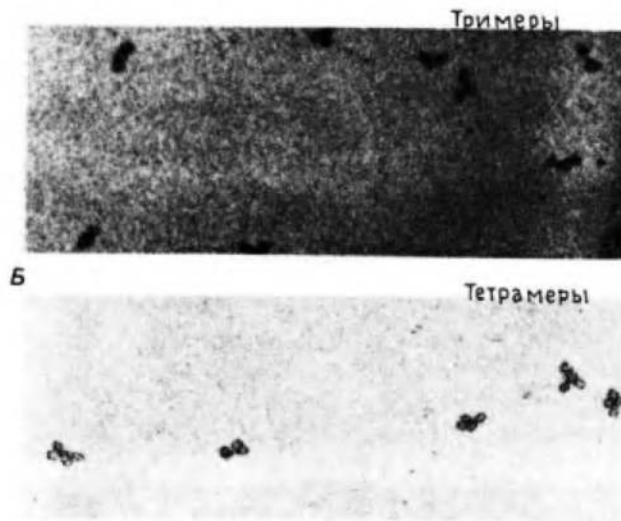
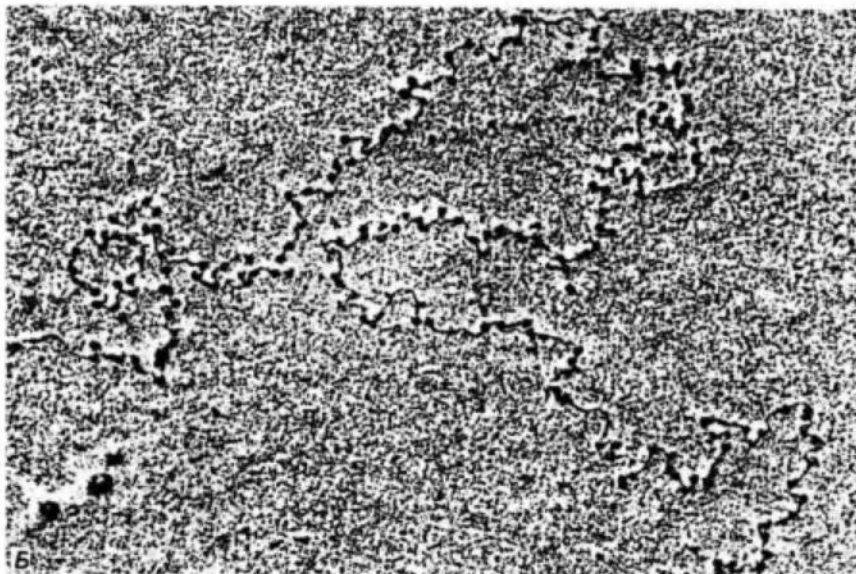


Рис. 12.24. Роль гистона H1 в компактизации хроматина. А. Хроматин из клеток печени курицы (электронная микрофотография). Нуклеосомы видны в виде глобул. Б. Тот же препарат хроматина после удаления гистона H1



в градиенте, были выделены фрагменты хроматина, из которых была экстрагирована ДНК и подвергнута электрофорезу. На полученной электрофореграмме виден набор дискретных фрагментов, отличающихся друг от друга на 200 пар оснований. На правой дорожке геля показана ДНК, экстрагированная после гидролиза нуклеазой, который был проведен до центрифугирования в градиенте сахарозы. (Б и В – из Finch et al., 1975.)



с помощью солевой элюции. Хроматин стал значительно менее компактным. (Из Oudet et al., 1975; фотография с любезного разрешения Р. Chambon.)

парам оснований (Hewish, Burgoyne, 1973; Noll, 1974). Если эти фрагменты хроматина, обработанного ДНКазой, рассматривать в электронный микроскоп, то фрагмент, содержащий 200 пар оснований, виден как сферическое тело (глобула) с небольшим хвостом. Последовательность из 400 пар оснований представляется в виде двух связанных глобул, а последовательность из 600 пар оснований содержит три сферических тела, связанные друг с другом (Finch et al., 1975). На основе этих наблюдений был сделан вывод, что главная субъединица хроматина содержит около 200 пар оснований ДНК и что микрококковая ДНКаза расщепляет ДНК преимущественно между нуклеосомами.

Роль гистонов в образовании этой структуры была продемонстрирована в опытах, в которых удалось реконструировать субъединицы хроматина в пробирке (Kornberg, Thomas, 1974). Смешивание гистонов H2A, H2B, H3 и H4 приводит к образованию только тетрамеров из H2A и H2B, а также тетрамеров из H3 и H4. Однако если к этой смеси гистонов добавить ДНК, то нуклеиновые кислоты и гистоны агрегируют с образованием нуклеосомной структуры с теми же самыми физическими и химическими свойствами, что и обычный хроматин.

Таким образом, хроматин можно представить себе как нитку нуклеосомных бус, связанных между собой 10–100 парами оснований ДНК. Гистоновый октамер состоит из двух молекул каждого из гистонов H2A, H2B, H3 и H4 и приблизительно 140 пар оснований ДНК, которая намотана на белковую глобулу. Гистон H1 не представлен в нуклеосомах, но в зависимости от физиологического состояния клетки может быть связан с линкерной ДНК между нуклеосомами. Эти нуклеосомы в свою очередь упаковываются в плотные структуры, а H1, по-видимому, участвует в наматывании нуклеосом друг на друга, особенно при подготовке к клеточному делению (рис. 12.24) (Weintraub, 1984). Кроме того, по крайней мере в одном случае, показано, что определяемая H1 конформация нуклеосом ингибирует транскрипцию специфических генов в соматических клетках (Schlissel, Brown, 1984).

Активация репрессированного хроматина

Доступность для *транс*-регуляторных факторов

Эксперименты по гибридизации в растворах свидетельствуют, что в геноме большинства позвоночных имеется по меньшей мере 10 000 тканеспецифических генов; и в клетках любого конкретного типа

активность почти всех этих генов репрессирована. Обычно считают, что «молчащее» состояние хроматина является репрессированным и что тканеспецифические гены активируются локальным удалением ингибирующих факторов (Weintraub, 1985). Как отмечено выше, главным механизмом общей репрессии генов является, вероятно, компактизация ДНК в кластеры нуклеосом. Если ДНК оказывается закрученной в эти плотные структуры, *транс*-регуляторные факторы инициации транскрипции не в состоянии найти последовательности ДНК, с которыми они могли бы связаться (Schlissel, Brown, 1984). Когда ДНК, содержащая промотор, входит в состав нуклеосом, соответствующие гены не могут транскрибироваться (Workman, Roeder, 1987). Однако, если к этим генам перед сборкой нуклеосом или во время сборки добавлен белок, связывающийся с ТАТА-боксом (TFIID), то реконструированный хроматин оказывается транскрипционно активным.

Специфическая для клеточного типа активация генов может проходить поэтому в два этапа. Во-первых, участок хроматина должен развернуться так, чтобы ген и его промотор стали доступными для транскрипционных факторов и РНК-полимеразы. Во-вторых, чтобы связаться с экспонированной ДНК, эти транскрипционные факторы должны присутствовать в ядрах.

Имеются данные, что в любой конкретной клетке транскрибируемые гены более доступны для РНК-полимеразы и *транс*-регуляторных факторов, чем нетранскрибируемые. (Иными словами, репрессировавшая система отменена локально в этих участках.) Основные данные в пользу этого положения получены в работах по определению чувствительности специфических генов различных клеток к ДНКазе. Доступность гена к ядерным белкам может быть оценена при обработке хроматина ткани небольшими количествами ДНКазы I (ДНКазы, отличающаяся по специфичности от микрококковой ДНКазы). Из обработанного хроматина экстрагируют ДНК и смешивают с радиоактивной кДНК для конкретного гена (рис. 12.25). Если кДНК находит последовательности для связывания, значит, соответствующий ген был защищен белками хроматина от переваривания ДНКазой (он был для нее недоступен), и этот ген будет, вероятно, недоступен также для РНК-полимеразы. Однако если зонд кДНК не находит последовательности для связывания, значит, этот ген был экспонирован для ДНКазы и будет, вероятно, доступен для РНК-полимеразы и *транс*-регуляторных факторов.

Было обнаружено, что чувствительность определенного гена к ДНКазе I зависит от типа клеток, в которых он находится (табл. 12.2) (Weintraub, Groudine, 1976). Когда хроматин из развивающихся эритроцитов курицы был обработан ДНКазой I,

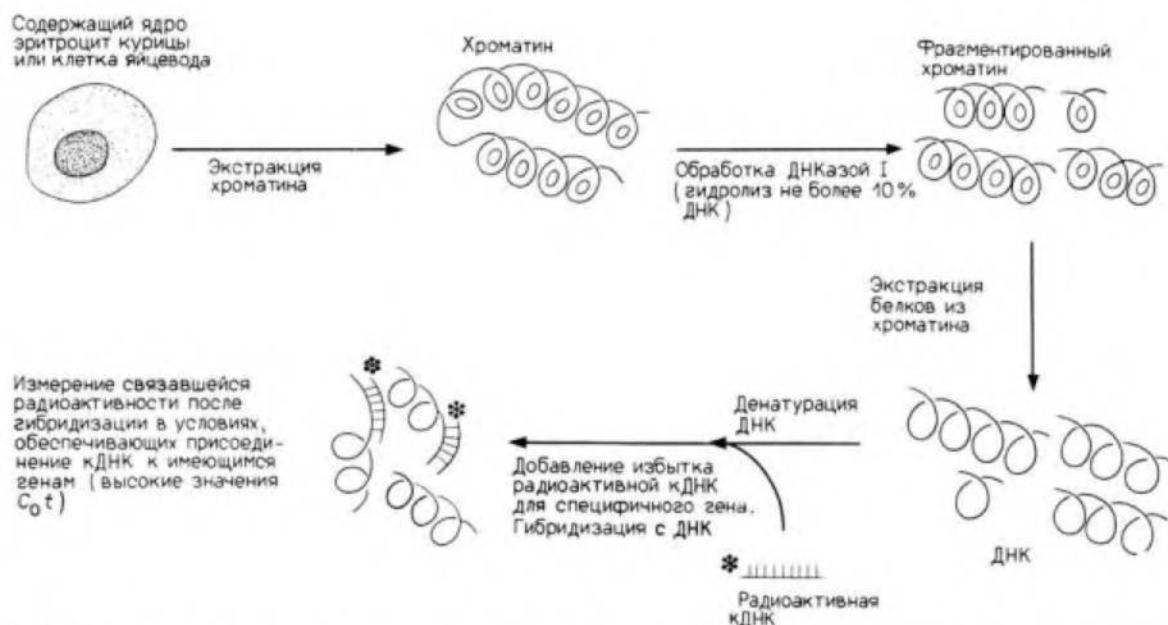


Рис. 12.25. Протокол опыта по определению специфичности гидролиза хроматина ДНКазой I. Результаты опыта см. в табл. 12.2.

затем из него была экстрагирована ДНК и смешана с радиоактивной глобиновой кДНК, глобиновой кДНК практически не было с чем связываться. Глобиновые гены в хроматине оказались гидролизованными небольшими количествами ДНКазы I. Однако обработка теми же количествами ДНКазы I хроматина из клеток мозга не приводила к деградации глобиновых генов. Поэтому глобиновые гены доступны для экзогенных ферментов в хроматине развивающихся эритроцитов, но не в хроматине клеток мозга.

Сходным образом ген овальбумина доступен для переваривания ДНКазой I в хроматине яйцевода и недоступен в хроматине эритроцитов. Когда хроматин обрабатывают ДНКазой I и экстрагируют ДНК, овальбуминовая кДНК способна найти комплементарные последовательности в препаратах из эритроцитов, но не в ДНК из хроматина яйцевода. Таким образом, здесь мы имеем четкую корреляцию между дифференциальной регуляцией генов и структурой хроматина.

Сайты, гиперчувствительные к ДНКазе

Помимо сайтов, чувствительных к ДНКазе I, существуют сайты, гиперчувствительные к ДНКазе I. Эти сайты, идентифицированные с помощью небольших радиоактивных фрагментов ДНК, гидролизуются крайне низкими количествами ДНКазы I, что свидетельствует об их чрезвычайной доступ-

ности для внешних молекул. Почти все гиперчувствительные участки, связанные с генами, активность которых регулируется в развитии, тканеспецифичны (Elgin, 1981; Conklin, Groudine, 1984). Сайты, гиперчувствительные к ДНКазе I, содержатся в глобиновых генах эритроцитов и их непосредственных пред-

Таблица 12.2. Опыты по связыванию кДНК-зондов с хроматином, обработанным ДНКазой I

Источник хроматина, обработанного ДНКазой I	Радиоактивный кДНК-зонд	Максимальное связывание радиоактивной кДНК с ДНК, экстрагированной из обработанного хроматина, %
ДНК эритроцитов курицы (без обработки ДНКазой)	Глобиновая кДНК	94
Хроматин клеток мозга курицы	Глобиновая кДНК	90–100
Хроматин фибробластов курицы	Глобиновая кДНК	90–100
Хроматин эритроцитов курицы	Глобиновая кДНК	25
Хроматин эритроцитов курицы	Овальбуминовая кДНК	90–100

Источник: Weintraub, Groudine, 1976.

шественников, но не содержатся в глобиновых генах других клеток (Stalder et al., 1980). В предшественниках эритроцитов из печени плода сайты, гиперчувствительные к ДНКазе I, лежат в пределах 200 пар оснований с 5'-стороны от кэп-сайтов в генах β -, γ - и δ -цепей глобина. Если хроматин экстрагируют из клеток костного мозга взрослых особей, то только δ - и β (взрослые)-глобиновые гены обнаруживают гиперчувствительность к ДНКазе I (Groudine et al., 1983). 5'-Фланкирующая область гена вителлогенина курицы содержит несколько гиперчувствительных сайтов в хроматине из печени кур-несушек, но эти сайты отсутствуют в хроматине печени петухов, хроматине эмбриональной печени, хроматине лимфоцитов и клеток мозга (Burch, Weintraub, 1983). Когда сайт, гиперчувствительный к ДНКазе I, был делетирован из 5'-области регулируемого в развитии гена белка из клеток слюнных желез дрозофилы, транскрипты этого гена не обнаруживались, а молекулы РНК-полимеразы не связывались с промотором этого гена (Shermoen, Beckendorf, 1982; Steiner et al., 1984).

Такие гиперчувствительные сайты располагаются обычно внутри или поблизости от сайтов, которые выполняют функции энхансеров. При исследовании энхансера, отвечающего на глюкокортикоид в вирусе рака молочной железы мыши, было обнаружено, что перед добавлением гормона к клеткам, несущим вирус, эта энхансерная последовательность не обладает повышенной чувствительностью к ДНКазе I (Zaret, Yamamoto, 1984). После введения гормона в этом участке появляется дискретный сайт, гиперчувствительный к ДНКазе I. Образование гиперчувствительного сайта совпадает с инициацией транскрипции вирусных генов; когда гормон удаляют, гиперчувствительный сайт исчезает и транскрипция вирусных генов прекращается. Исследователи полагают, что взаимодействие между комплексом глюкокортикоид-рецептор и ДНК энхансера изменяет конфигурацию хроматина, способствуя транскрипции с ближайшего промотора.

Внутри гиперчувствительного участка овальбуминового гена курицы картирован сайт связывания прогестерона (Mulvihill et al., 1982). Введение эстрогена способно индуцировать образование четырех сайтов, чувствительных к ДНКазе I, в 5'-фланкирующей области этого гена (Kaye et al., 1986), однако после удаления эстрогена три из этих сайтов исчезают. Энхансеры для гена инсулина крысы и β -глобинового гена курицы также лежат внутри участков, гиперчувствительных к ДНКазе I (Emerson et al., 1985; Ohlsson, Edlund, 1986).

Гиперчувствительность к ДНКазе и характер метилирования

Во взаимоотношениях между сайтами, гиперчувствительными к ДНКазе, энхансерными элементами и сайтами метилирования легко запутаться. У курицы активность гена главного желточного белка вителлогенина II регулируется эстрогеном, и синтезируется этот белок только в печени кур-несушек. В генах вителлогенина, находящихся в хроматине печени, уже до стимуляции гормоном имеются четыре сайта, гиперчувствительные к ДНКазе I. Следовательно, они существуют прежде, чем в этом локусе начинается транскрипция (Burch, Weintraub, 1983). Эти гиперчувствительные сайты (указаны стрелками «А» на рис. 12.26, Г) находятся в середине и в 3'-фланкирующей области гена в хроматине печени, но отсутствуют в хроматине эритроцитов, фибробластов и нейронов. После стимуляции эстрогеном возникают три новых сайта, гиперчувствительных к ДНКазе I. Они лежат в 5'-фланкирующей области гена и связаны с энхансерными элементами, которые присоединяют рецептор эстрогена (Burch, Weintraub, 1983). Кроме того, расположенный в этой области ЦГ-сайт, который обычно метилирован у зародышей и у петухов, при добавлении эстрогена становится неметилированным (указан кружком на рис. 12.26). После удаления эстрогена один из 5'-чувствительных сайтов исчезает, хотя другие сайты (и характер деметилирования) сохраняются. Ни деметилирования, ни возникновения новых гиперчувствительных сайтов в гене вителлогенина в клетках других типов не наблюдается.

Высказано предположение, что деметилирование необходимо для появления сайтов, гиперчувствительных к ДНКазе I (Keshet et al., 1986). Если неметилированные глобиновые гены трансфицировали в ядра фибробластов мыши, то в них обнаруживались сайты, чувствительные к ДНКазе (независимо от способности генов к транскрипции). Если же эти гены были метилированы по каждому ЦФГ-сайту, то чувствительные к ДНКазе участки не возникали.

Регуляция активности генов

Как могут существовать участки, гиперчувствительные к ДНКазе I, если ДНК единообразно упакована в нуклеосомы? На этот вопрос возможны два ответа. Первый – в хроматине существуют области, свободные от нуклеосом, и второй – существуют факторы, которые присоединяются к нуклеосомам и заставляют их ослаблять связь с ДНК.

Отсутствие нуклеосом обеспечивает доступность всей ДНК в этой области для РНК-полимеразы и возможность осуществления эффективной транс-

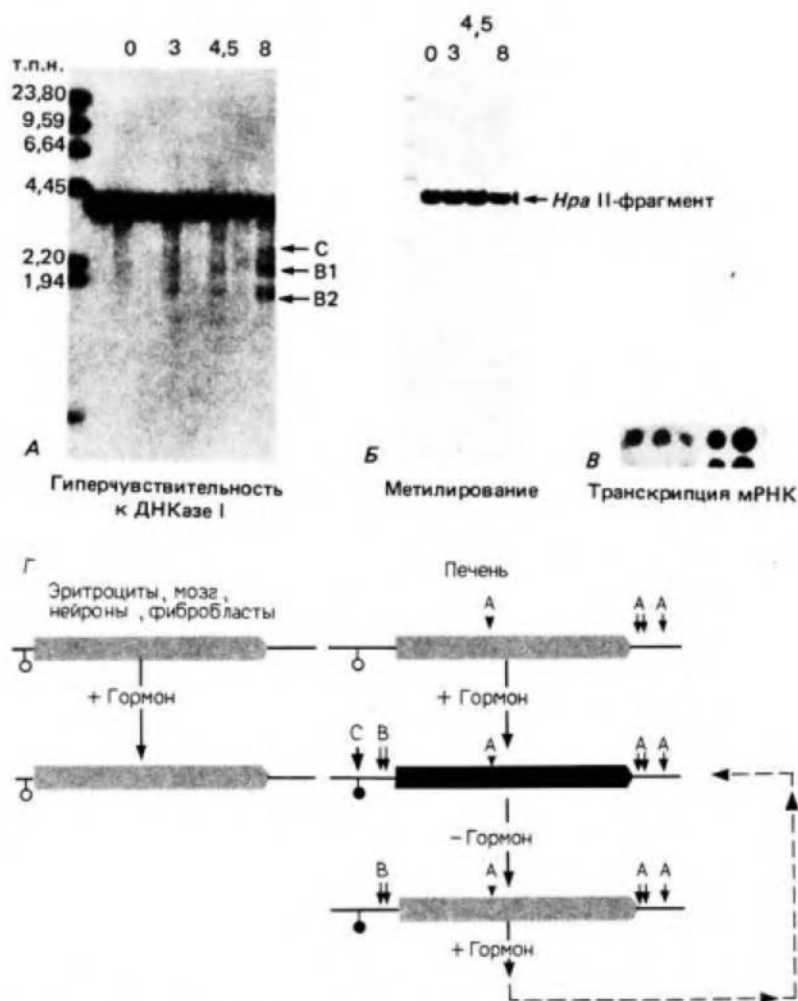


Рис. 12.26. Корреляция транскрипции с гиперчувствительностью к ДНКазе I и гипометилированием в сайтах энхансеров. А. Определение гиперчувствительности к ДНКазе I при гидролизе хроматина печени через 0; 3; 4,5 и 8 ч после обработки эстрогеном. Левая дорожка для каждого времени соответствует негидролизованному хроматину. Появление новых коротких фрагментов через 8 ч после обработки эстрогеном указывает на расщепление ДНКазой соответствующих участков. Радиоактивный зонд свидетельствует о присутствии ДНК из 5'-конца гена. С, B1 и B2 соответствуют сайтам гена, показанным на схеме Г. Б. Определение метилирования в ДНК печени в различные сроки после обработки гормоном. ДНК гидролизовали рестриктазой *Hpa*II. В период до 8 ч зонд узнает ДНК в большом *Hpa*II-фрагменте. Через 8 ч появляется второй фрагмент. Это означает, что исходно метилированная последовательность ЦЦГГ в соответствующем участке стала неметилированной. В. Дот-блот-гибридизация цитоплазматической мРНК с кДНК-зондом для вителлогенина. Впервые транскрипция наблюдается приблизительно на 8-м часу. Г. Результаты опытов. Перед добавлением гормона в хроматине печени имеются три сайта, гиперчувствительных к ДНКазе I; в хроматине из других клеток не имеется ни одного гиперчувствительного сайта. Добавление гормона вызывает появление в клетках печени трех новых сайтов, гиперчувствительных к ДНКазе I, на 5'-конце гена и гипометилирование этого участка (обозначено черным кружком). В клетках из других органов не наблюдается ни гипометилирования, ни гиперчувствительности к ДНКазе I. Удаление гормона приводит к исчезновению в хроматине печени одного гиперчувствительного сайта, специфического для гормона, и к потере транскрипционной активности. (Из Burch, Weintraub, 1983; фотография с любезного разрешения авторов.)

крипции. У клопа-наземника *Oncopeltus fasciatus* часть генома, содержащая гены рибосомной РНК, практически полностью свободна от нуклеосом и ДНК в этой области транскрибируется очень активно (Foe et al., 1976). Результаты электронно-микрос-

копических исследований подтвердили это наблюдение для *Oncopeltus* и некоторых других видов (рис. 12.27) (Labhart, Koller, 1982).

Транскрипция глобиновых генов мыши тоже может происходить с нарушениями в распределении

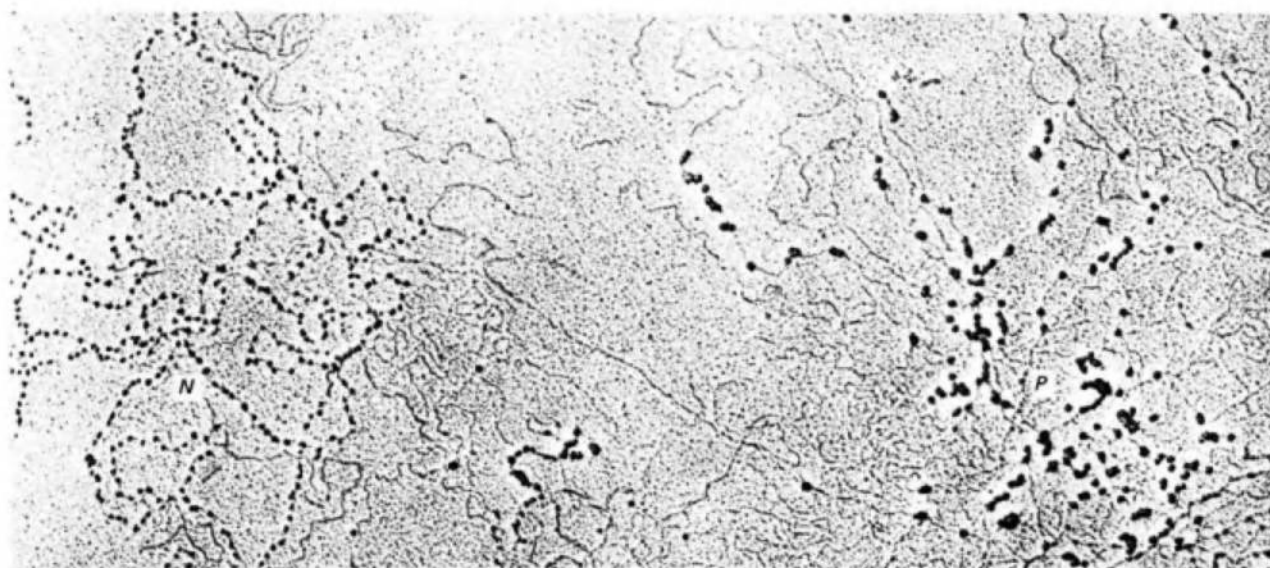


Рис. 12.27. Активные и неактивные области в геноме *Xenopus*. Хроматин, выделенный из клеток этой лягушки, обрабатывали РНКазой для удаления новообразованных цепей РНК и фиксировали для электронной микроскопии. Видны две области хроматина: в области *P* (справа) присутствуют крупные белковые молекулы (предположительно РНК-полимеразы); в области *N* (слева) видны нуклеосомы без РНК-полимераз. (Из Labhart, Koller, 1982; фотография с любезного разрешения Т. Коллера.)

нуклеосом. В клетках, которые не относятся к эритроидному ряду, нуклеосомы на всем протяжении глобиновых генов располагаются регулярно. Однако в предшественниках эритроцитов регулярное расположение нуклеосом нарушается, так что 5'-конец гена (от -200 до $+500$) оказывается свободным от этих структур. Когда клетки индуцируются к синтезу гемоглобина, может происходить дальнейшее разрушение нуклеосом (Cohen, Sheffery, 1985; Ben-zra et al., 1986).

Данные, полученные в других исследованиях, также свидетельствуют о том, что большинство участков, гиперчувствительных к ДНКазе I (а возможно, и все такие участки), лишены нуклеосом. Гены легких цепей иммуноглобулинов становятся гипометилированными и чувствительными к ДНКазе I в ходе развития пре-В-клеток в В-клетки (Rose, Gattard, 1984). Кроме того, в это время меняется распределение нуклеосом, так что большие области иммуноглобулинового гена становятся относительно свободными от них. Остающиеся нуклеосомы оказываются без гистона H1 и содержат вместо него белки HMG 14 и HMG 17 (см. ниже).

Не исключено, что способ взаимодействия метильных групп с гистонами позволяет образовывать нуклеосомы только на метилированной ДНК, но не на неметилированной (Keshet et al., 1986). Это ограничение будет приводить к появлению участков

гиперчувствительности к ДНКазе. После образования таких участков другим *транс*-регуляторным фактором станет проще находить эти свободные от нуклеосом области. Такая последовательность событий могла бы объяснить, почему ген вителлогенина в печени курицы содержит ряд сайтов, гиперчувствительных к ДНКазе, уже перед добавлением гормона. Присоединение *транс*-регуляторного рецептора гормона будет создавать впоследствии новые гиперчувствительные сайты, связанные с активной транскрипцией.

Формирование активного участка хроматина не требует полного удаления нуклеосом. Многие активно транскрибируемые гены лежат внутри районов с обычным распределением нуклеосом. Тем не менее нуклеосомы могут быть модифицированы в определенных специфических локусах. Одна из таких наиболее важных модификаций включает присоединение двух пептидов, называемых **белками группы высокой подвижности: HMG 14 и HMG 17**.

Когда хроматин гидролизуют ДНКазой I, происходит преимущественное высвобождение двух негистоновых белков хроматина: HMG 14 и HMG 17. Эти два низкомолекулярных белка могут быть экстрагированы из хроматина с помощью 0.35 M NaCl . Они, по-видимому, обеспечивают чувствительность, но не гиперчувствительность генов к ДНКазе I, когда связываются поблизости от нуклеосом. Если

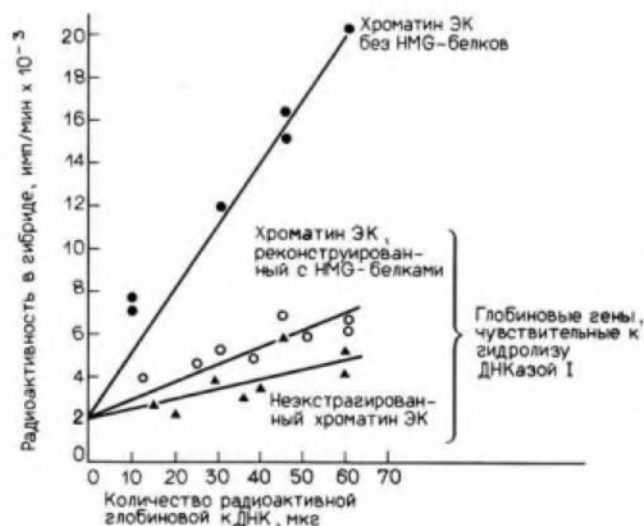


Рис. 12.28. Реконструкция чувствительности к ДНКазе I области глобинового гена. Из хроматина эритроцитов курицы (ЭК) удаляли НМГ-белки. Одну фракцию хроматина инкубировали без НМГ-белков, а другую фракцию реконструировали, добавляя эти белки. К обеим фракциям и неэкстрагированному хроматину ЭК добавляли ДНКазу I в количестве, достаточном для гидролиза 10% ДНК. Эффективность связывания радиоактивной глобиновой кДНК с комплементарными последовательностями в препарате хроматина, лишённого НМГ-белков, была намного выше, чем в других препаратах. (Данные из Weisbrod, Weintraub, 1979.)

белки НМГ 14 и НМГ 17 удаляют из хроматина, то одновременно исчезает дифференциальная чувствительность специфических генов к ДНКазе I. Таким образом, когда белки НМГ экстрагированы из хроматина эритроцитов, глобиновые гены утрачивают чувствительность к перевариванию ДНКазой I (рис. 12.28). Однако, когда эти белки добавляют к такому обедненному хроматину, дифференциальная чувствительность глобиновых генов восстанавливается (Weisbrod, Weintraub, 1979; Weisbrod et al., 1980; Gazit et al., 1980). Способность этих белков восстанавливать чувствительность по-прежнему определяется хроматином. НМГ 14 и НМГ 17, выделенные из мозга, восстанавливают чувствительность к ДНКазе I глобиновых генов из эритроцитов, но не из клеток мозга. Таким образом, два негистоновых белка хроматина оказываются необходимыми (но не достаточными) для осуществления транскрипции специфических генов в разных тканях.

Связь активной ДНК с ядерным матриксом

Присоединение активного хроматина к ядерному матриксу

Внутри ядра репликативные ферменты должны каким-то образом найти сайты для инициации синтеза ДНК; транскрипционные факторы и полимеразы должны найти свои промоторы и энхансеры; факторы процессинга РНК должны найти сайты для сплайсинга РНК, а мРНК должна успешно найти поры, через которые она уйдет из ядра. Это слишком сложная задача для молекул в растворе. Нам пришлось бы предположить, что различные факторы, участвующие в транскрипции, плавают в ядерном соке, сталкиваясь случайно с ДНК. Молекулы РНК, образованные таким образом, будут затем подвергаться сплайсингу и сталкиваться в ядре до тех пор, пока не найдут ядерные поры, через которые покинут ядро.

Альтернативная модель предполагает, что РНК транскрибируется на твердом субстрате, где собраны вместе все ферменты, необходимые для транскрипции, процессинга и транспорта. Для таких представлений имеются прецеденты. Подобным упорядоченным агрегатом является цепь транспорта электронов в митохондриях, и давно известно, что ДНК-синтезирующие ферменты бактерий собраны на внутренней поверхности клеточной мембраны. В таком случае можно поставить следующие вопросы: существует ли ядерный ретикулум, где могли бы находиться подобные ферменты? Если такой матрикс существует, локализованы ли на нем активно

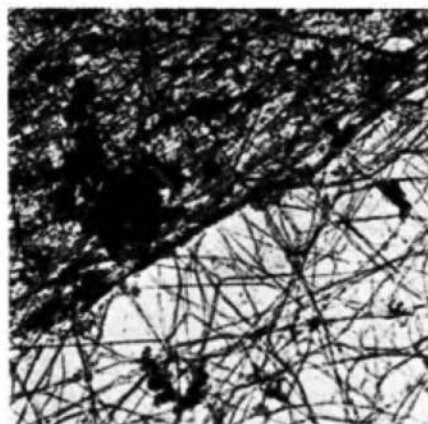


Рис. 12.29. Участок ядерного матрикса (слева) и окружающая цитоплазма (электронная микрофотография; $\times 47\,000$). Хорошо видны филаменты цитоскелета. Ядра выделяли из фибробластов мыши, экстрагировали детергентом для удаления липидов и затем обрабатывали ДНКазой I. (Из Carpo et al., 1982; фотография с любезного разрешения S. Penman.)

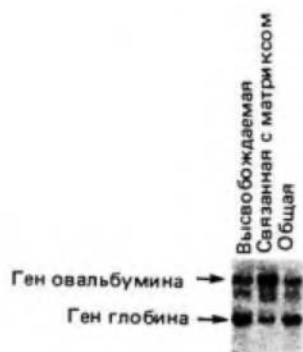


Рис. 12.30. Саузерн-блот, демонстрирующий фрагменты ДНК, защищенные ядерным матриксом, а также фрагменты, которые высвобождались из ядер после обработки рестриктазой *EcoRI*. ДНК, высвобождаемую обработкой *EcoRI*, фракционировали с помощью электрофореза одновременно с ДНК, выделенной из ядерного матрикса и не солибилизированной при обработке *EcoRI*, а также с общей клеточной ДНК из яйцевода курицы, стимулированного эстрогеном. ДНК переносили блоттингом на нитроцеллюлозный фильтр и гибридизовали с радиоактивными рестрикционными фрагментами из генов овальбумина и β -глобина. Глобиновый ген не связывался с матриксом, а овальбуминовый ген присоединялся к фракции матрикса. (Из Ciejek et al., 1983; фотография с любезного разрешения B. W. O'Malley.)

транскрибируемые гены? Если такой матрикс существует, находятся ли на нем РНК-синтезирующие ферменты?

Ядерный матрикс можно выделить путем сепарирования ядер в детергентах и гидролиза большей части ДНК с помощью ДНКаз (Berezney, Coffey, 1977; Carpo et al., 1982). На электронной микрофотографии подобных комплексов выявляется сеть белков, которая пронизывает ядро и присоединяется на ядерной оболочке к цитоскелету (рис. 12.29). Такой матрикс наблюдали во всех эукариотических ядрах, исследованных до настоящего времени (Nelson et al., 1986).

При выделении матрикса данным методом ДНКаз удаляет до 98% ДНК. Содержит ли ДНК, которая остается связанной с матриксом (и, вероятно, защищенная от ДНКаз благодаря прочной связи с ним), активно транскрибируемые гены? Мы располагаем данными, что это и в самом деле так, по крайней мере для некоторых генов. Было показано, что ген овальбумина связан предпочтительно с ядерным матриксом в клетках яйцевода, но не в клетках печени или эритроцитах курицы (Robinson et al., 1982). При этом с ядерным матриксом клеток яйцевода, не были ассоциированы глобиновые гены. Другая группа исследователей подтвердила и развила эти наблюдения (Ciejek et al., 1983), показав, что вся индуцируемая гормоном единица транскрипции

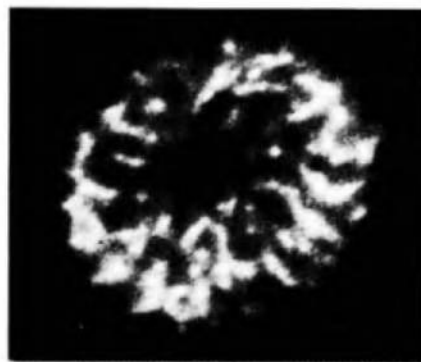


Рис. 12.31. Расположение активного хроматина на периферии ядра и вдоль каналов. Ядра эритроцитов обрабатывали ДНКазой I, которая, как полагают, создает разрывы в участках хроматина, активных в транскрипции. Такие разрывы репарируются в ядрах с помощью ник-трансляции в присутствии меченых нуклеотидов, которые можно визуализировать по флуоресценции. Эти меченые нуклеотиды обнаруживаются на периферии ядра и вдоль структур, идущих от ядерной оболочки внутрь ядра. (Из Hutchinson, Weintraub, 1985; фотография с любезного разрешения N. Hutchinson.)

(включающая ген овальбумина и два соседних гена X и Y) связана с ядерным матриксом (рис. 12.30). Других генов, ассоциированных с матриксом, не было среди исследованных 100 000 пар оснований ДНК. Когда у животных удаляли эстроген, исчезало специфическое присоединение этих генов к ядерному матриксу. Оказалось, что эти гены связаны с ядерным матриксом, только когда они активированы.

В 1985 г. Хатчинсон и Вайнтрауб (Hutchinson, Weintraub, 1985) обнаружили, что сайты, чувствительные к ДНКазе I, распределяются по ядру неравномерно. Эти авторы обрабатывали ядра ДНКазой I и затем, не разрушая ядер, проводили в них реакцию ник-трансляции. При этом меченая ДНК должна представлять только активно транскрибируемые (т.е. чувствительные к ДНКазе I) гены. Результаты этого опыта (рис. 12.31) показали, что ДНК, чувствительная к ДНКазе I, располагается на периферии ядер и вдоль каналов или волокон, которые присоединены к ядерной оболочке. В этом случае активные гены, вероятно, специфически ассоциированы с ядерным матриксом.

Третья группа данных, свидетельствующих об участии ядерного матрикса в транскрипции, включает наблюдения, что большая часть (в некоторых сообщениях 95%) новосинтезированной РНК оказывается присоединенной к ядерному матриксу (Miller et al., 1976; Herman et al., 1978; Mariman et al., 1982; van Eekelen, van Venrooij, 1981). Эта связь, по-видимому, осуществляется при участии особого белка ядерного матрикса. С учетом того, что активные

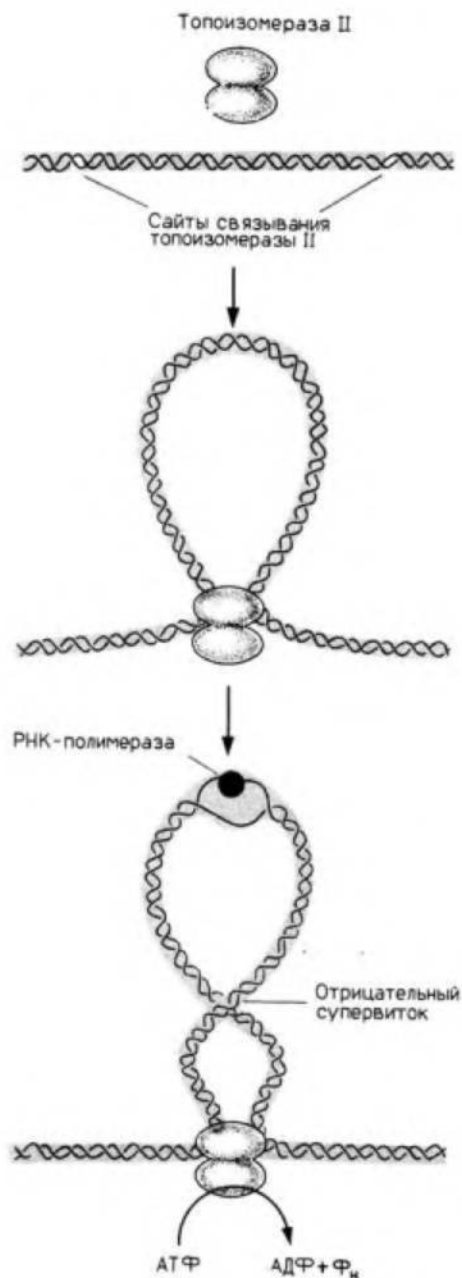


Рис. 12.32. Суперспирализация ДНК в ходе транскрипции. Топоизомераза II связывает друг с другом два участка ДНК и индуцирует суперспирализацию путем временного разрыва и последующего воссоединения цепей ДНК. В результате упругого напряжения участок двойной спирали разделяется на две цепи, что позволяет РНК-полимеразе (предположительно и другим *транс*-регуляторным белкам) инициировать транскрипцию. Сайты связывания топоизомеразы обнаружены в ДНК, ассоциированной с матриксом (Cockerill, Garrard, 1986). (По Darnell et al., 1986.)

гены, РНК-полимераза и новосинтезированные транскрипты оказываются связанными с ядерным матриксом, было высказано предположение (Jackson, Cook, 1985), что транскрипция не осуществляется мобильной полимеразой, передвигающейся вдоль гена. По представлениям этих исследователей, вероятнее, что РНК-полимераза прикреплена к ядерному матриксу, а ДНК протягивается через нее.

Топоизомеразы и транскрипция генов

Полагают, что репликация ДНК происходит на ядерном матриксе и один из связанных с матриксом ферментов обеспечивает раскручивание спирали ДНК. Нужен ли подобный фермент для транскрипции РНК? Недавние исследования показали, что раскручивание спирали ДНК играет важную роль, способствуя транскрипции РНК. Чтобы цепи ДНК разошлись, транскрипционно активный хроматин должен быть закручен (Ryoji, Worcel, 1984), и это закручивание осуществляется с помощью суперспирализации ДНК (рис. 12.32). Если суперспирализованные кольцевые плазмиды инъецировали в ядра ооцитов *Xenopus*, то эти плазмиды транскрибировались. Если же эти плазмиды линейаризовали (раскрывая их с помощью рестриктазы), то после инъекции в клетки они не транскрибировались (Harland et al., 1983; Pruitt, Reeder, 1984). Показано, что чувствительные к ДНКазе I сайты в активных генах возникают только в тех случаях, когда эти гены находятся под торзионным напряжением (Villeponteau et al., 1984). Ферментом, который ответствен за скручивание ДНК, позволяющее цепям ДНК разделиться, является **топоизомераза II**. С помощью антител к этому белку продемонстрировано, что топоизомераза II расположена в комплексе внутреннего ядерного матрикса с ядерной оболочкой (Berrios et al., 1985).

Когда к ядерным препаратам добавляется ингибитор топоизомеразы II новобиоцин, напряжение с генов снимается, сайты, чувствительные к ДНКазе, исчезают, и транскрипция прекращается (Han et al., 1985; Glikin et al., 1984). Прикрепление ДНК к матриксу может быть необходимо также для предотвращения свободного вращения ДНК, что позволяет связанным с матриксом топоизомеразам скручивать хроматин (Cockerill, Garrard, 1986).

Z-ДНК и петлевые структуры

Одним из результатов суперспирализации может быть переход ДНК в альтернативную конформацию, отличающуюся от стандартной В-формы двойной спирали Уотсона-Крика. Суперспирализация

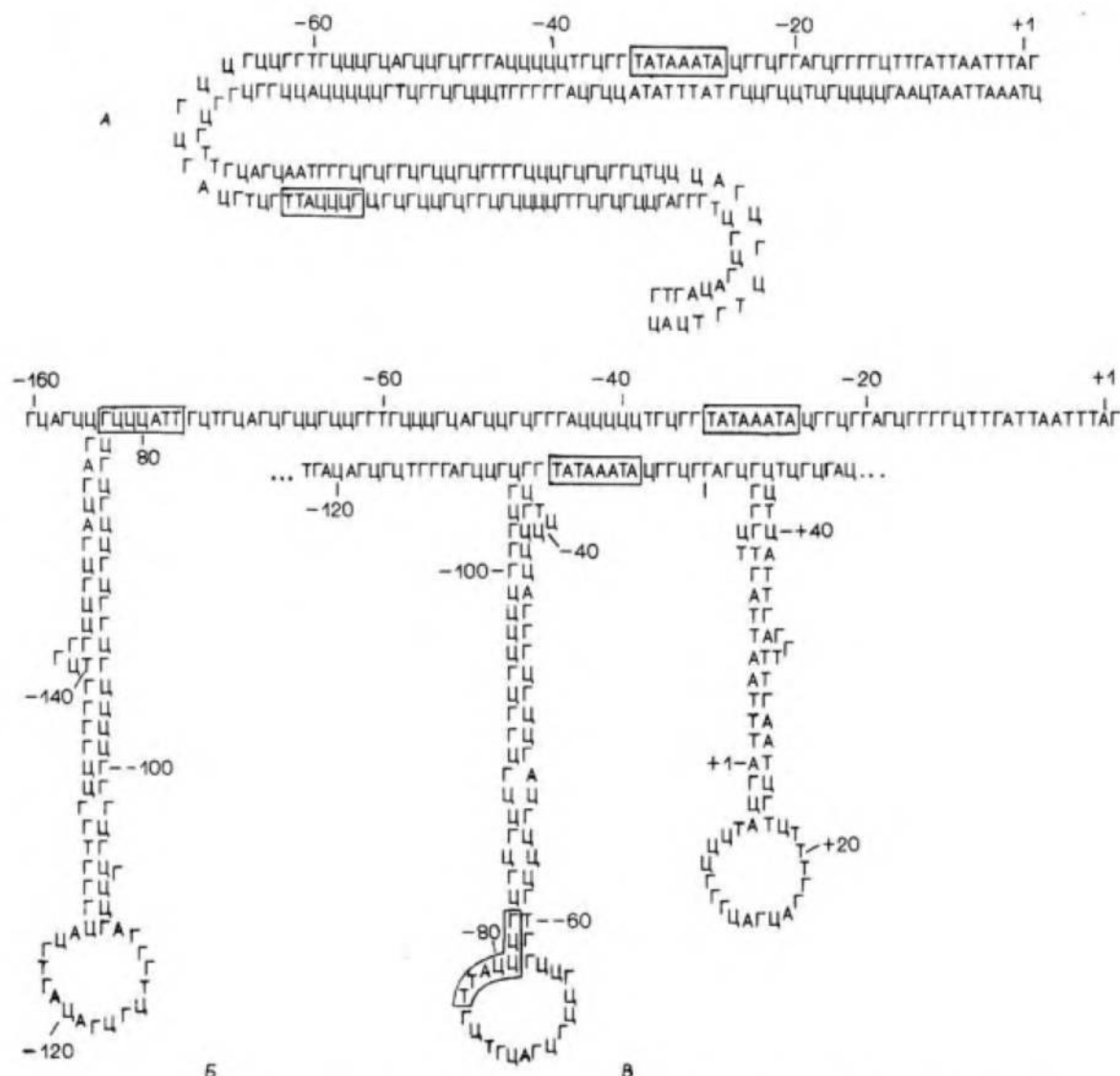


Рис. 12.33. Возможные вторичные структуры, образуемые областью промотора гена $\alpha 2$ коллагена курицы. Последовательности ТАТА и СААТ заключены в прямоугольники; +1 указывает место инициации синтеза РНК. А. Стандартное соединение комплементарных оснований. Б, В. Стабильные «шпильчатые» структуры, содержащие одноцепочечные участки. Изображена только одна из комплементарных цепей, другая цепь образует аналогичную петлю. (По Vogel et al., 1981.)

ДНК может привести к образованию «левозакрученной» Z-ДНК или петлевых структур. Образование петель постулируется в тех случаях, когда по термодинамическим причинам может происходить спаривание двух комплементарных участков одной цепи ДНК с большей вероятностью, чем спаривание двух цепей. На рис. 12.33 показано возможное спаривание оснований внутри одной цепи на 5'-конце гена коллагена 22 курицы. Высказано предположение (Larsen, Weintraub, 1982), что такие петлевые

структуры являются сайтами узнавания для *транс*-регуляторных белков, и эти белки, будучи связанными, предотвращают образование нуклеосом в этой области ДНК.

Другой конформационный переход, который может происходить под действием скручивания, — это переход в Z-ДНК (Johnston, Rich, 1985; Kohwi-Shigematsu, Kohwi, 1985). Большая часть ядерной ДНК представлена правозакрученной двойной спиралью в В-форме, описанной Уотсоном и Криком. Одна-

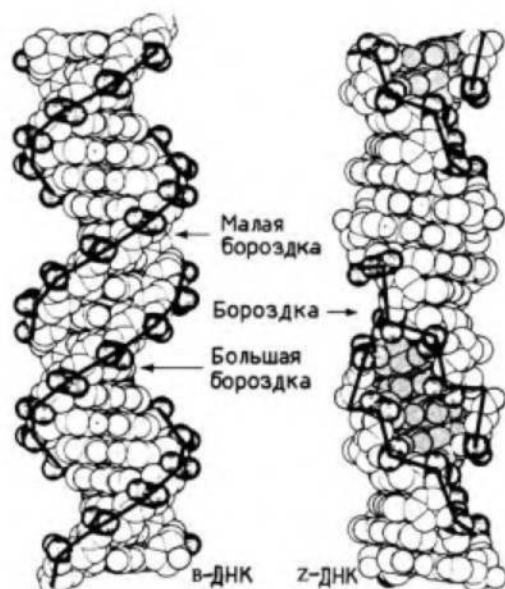


Рис. 12.34. Сравнение правозакрученной (В) и левозакрученной (Z) ДНК. Видна разница в строении этих двух спиральных структур. (Из Wang et al., 1979; с любезного разрешения A. Rich.)

ко Рич и его коллеги обнаружили, что определенные ЦГ-богатые последовательности, такие как ЦГЦГЦГ, образуют предпочтительно *левозакрученные* двойные спирали (Wang et al., 1979). Физические свойства этой левозакрученной структуры отличаются от свойств стандартной ДНК. Левозакрученная спираль содержит 12 пар оснований на 1 виток (а не 10) и принимает конформацию «зиг-заг» (отсюда название «Z-ДНК»). Помимо этого в Z-ДНК нет большой бороздки, которая обеспечивает присоединение ряда молекул к B-ДНК (рис. 12.34).

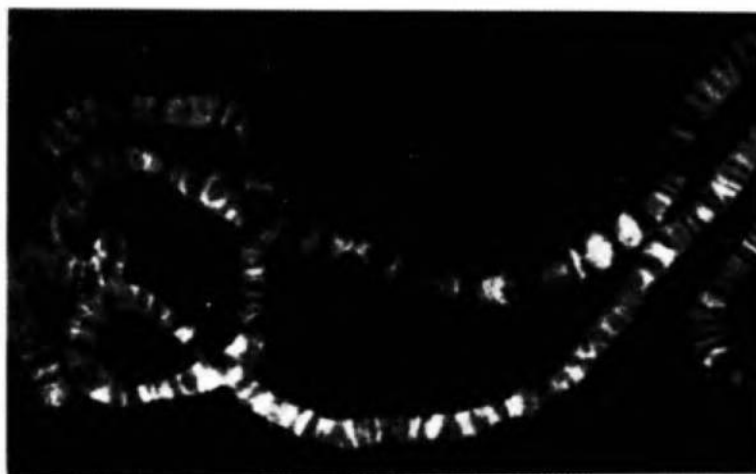
Такая левозакрученная Z-ДНК обнаружена в геномах млекопитающих и дрозофилы. С помощью антител к Z-ДНК было показано, что Z-ДНК имеется на всем протяжении поличенных хромосом дрозофилы (рис. 12.35). При этом она локализована в зонах между дисками. Считают, что эти междисковые зоны контролируют экспрессию генов, лежащих внутри дисков (Nordheim et al., 1981).

Вначале полагали, что переход из B-ДНК в Z-ДНК может происходить только в условиях высокой концентрации солей. Однако позже было показано (Behe, Felsenfeld, 1981), что Z-ДНК формируется естественным образом при физиологических концентрациях солей, если остатки цитидинов в чередующихся ГЦ-полимерах метилированы. Таким образом, метилирование цитидина может позволить B-ДНК перейти в Z-конформацию. Кроме того, в отличие от B-ДНК, которая ускоряет формирование нуклеосом из гистонов, Z-ДНК эффективно подавляет формирование нуклеосом (Nickol et al., 1982). На самом деле гистоны будут связываться с Z-ДНК, но они не будут ассоциироваться в нуклеосомный октамер.

РЕЗЮМЕ

В данный момент у нас в руках части одной или нескольких головоломок. Мы не уверены, что имеем все части, и даже не знаем, сколько всего головоломок. Вполне вероятно, что существует несколько способов активации транскрипции. За прошедшие пять лет выяснилось, что образования «активных генов» еще недостаточно для транскрипции. Помимо этого требуется «активный хроматин». В настоящее время изучается взаимоотношение между альтернативными структурами генов (метилирован-

Рис. 12.35. Политенные хромосомы из слюнных желез дрозофилы, окрашенные флуоресцентными антителами к Z-ДНК. Антитела связываются с многочисленными междисковыми участками. (Из Nordheim et al., 1981; фотография с любезного разрешения A. Rich.)



ными и неметилированными; В-ДНК и петлями, или Z-ДНК) и альтернативными структурами хроматина (НМГ-модифицированными нуклеосомами и немодифицированными; свободными от нуклеосом-областями и областями, содержащими нуклеосомы). Участие гистона H1 в общем подавлении транскрипции и участие скручивания в активации специфических локальных участков представляются ключевыми элементами в регуляции генов. Остается выяснить, каким образом хроматин информируется о том, какую структуру ему следует принять.

Вероятно, существуют определенные реципрокные взаимодействия между ДНК и хроматином. Посредством этих взаимодействий ДНК может управлять формообразованием хроматина в конкретном направлении, а данное изменение в структуре хроматина может в свою очередь позволить ДНК изменить свою структуру определенным образом. Одна из моделей заключается в следующем: когда ДНК реплицируется, нуклеосомы разрушаются. На этом этапе характер метилирования может быть изменен или сохранен¹. В активных генах некоторые из *транс*-регуляторных факторов (такие, как ТАТА-связывающий белок) могут присоединяться к ДНК и эти участки ДНК избегают конденсации с участием гистона H1. Вместе с тем нуклеосомы в гипометилированных участках могут изменить конформацию так, что окажутся способными присоединить НМГ 14 и НМГ 17. Экспонированная ДНК может затем связаться с топоизомеразой на ядерном матриксе. Это присоединение позволит ДНК закрутиться таким образом, что в участках промоторных и энхансерных последовательностей возникнут альтернативные структуры. В этих местах *цис*-последовательности могли бы затем присоединить *транс*-регуляторные белки и РНК-полимеразу для осуществления транскрипции. Это лишь одна из возможных моделей, удовлетворяющих экспериментальным данным, но и против нее имеются возражения. Как заметил Альбер Клод, мы только начали составлять опись обретенного нами богатства.

ЛИТЕРАТУРА

- Atchinson M. L., Perry R. P. (1987). The role of κ -enhancer and its binding factor NF- κ B in the developmental regulation of κ gene transcription. *Cell* **48**, 121–128.
- Banerji J., Olson L., Schaffner W. (1983). A lymphocyte-specific cellular enhancer is located down-stream of the joining region in immunoglobulin heavy chain genes. *Cell* **33**, 729–740.
- Behe M., Felsenfeld G. (1981). Effects of methylation on a synthetic polynucleotide. The B–Z transition in poly(dG-m⁵dC)·poly(dG-m⁵dC). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 1619–1623.
- Benezra R., Cantor C. R., Axel R. (1986). Nucleosomes are phased along the mouse β -major globin gene in erythroid and non-erythroid cells. *Cell* **44**, 697–704.
- Berezney R., Coffey D. S. (1977). Nuclear matrix: Isolation and characterization of a framework structure from rat liver nuclei. *J. Cell Biol.* **73**, 616–637.
- Bergman Y., Rice D., Grosschedl R., Baltimore D. (1984). Two regulatory elements for immunoglobulin κ light chain gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 7041–7045.
- Berrios M., Osheroff N., Fisher P. A. (1985). In situ localization of DNA topoisomerase II, a major polypeptide component of the *Drosophila* nuclear matrix fraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 4142–4146.
- Bodner M., Karin M. (1987). A pituitary-specific *trans*-acting factor can stimulate transcription from the growth hormone promoter in extracts of non-expressing cells. *Cell* **50**, 267–275.
- Boulet A. M., Erwin C. R., Rutter W. J. (1986). Cell-specific enhancers in the rat exocrine pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 3599–3603.
- Browder L. W. (1984). *Developmental Biology*. Saunders, Philadelphia.
- Burch J. B., Weintraub H. (1983). Temporal order of chromatin structural changes associated with activation of the major chicken vitellogenin gene. *Cell* **33**, 65–76.
- Burlingame R. W., Love W. E., Wang B.-C., Hamlin R., Xuong N.-H., Moudrianakis E. N. (1985). Crystallographic structure of the octameric histone core of the nucleosome at a resolution of 3.3 Å. *Science* **228**, 246–253.
- Busslinger M., Hurst J., Flavell R. A. (1983). DNA methylation and the regulation of globin gene expression. *Cell* **34**, 197–206.
- Capco D. G., Wan K. M., Penman S. (1982). The nuclear matrix: Three-dimensional architecture and protein composition. *Cell* **29**, 847–858.
- Chandler V. L., Maier B. A., Yamamoto K. R. (1983). DNA sequences bound specifically by glucocorticoid receptor in vitro render a heterologous promoter hormone responsive in vivo. *Cell* **33**, 489–499.
- Ciepek E. M., Tsai M.-J., O'Malley B. W. (1983). Actively transcribed genes are associated with the nuclear matrix. *Nature* **306**, 607–609.
- Cockerill P. N., Garard W. T. (1986). Chromosome loop anchorage of the κ immunoglobulin gene occurs next to the enhancer in a region containing topoisomerase II sites. *Cell* **44**, 273–282.
- Cohen R. B., Sheffery M. (1985). Nucleosome disruption precedes transcription and is largely limited to the transcribed domain of globin genes in murine erythroleukemia cells. *J. Mol. Biol.* **182**, 109–129.
- Compere S. J., Palmiter R. D. (1981). DNA methylation controls the inducibility of the mouse metallothionein-I gene in lymphoid cells. *Cell* **25**, 233–240.
- Conklin K. F., Groudine M. (1984). Chromatin structure and gene expression. In: A. Razin, H. Cedar and A. D. Riggs (eds.), *DNA Methylation*. Springer-Verlag, New York, pp. 293–351.
- Darnell J., Lodish H., Baltimore D. (1986). *Molecular Cell Biology*. Scientific American Books, New York.
- Davison B. L., Edgley J. M., Mulvihill E. R., Chambon P. (1983). Formation of stable preinitiation complexes between eukaryotic class B transcription factors and promoter sequences. *Nature* **301**, 680–686.
- Dierks P., van Ooyen A., Chochran M. D., Dobkin C., Reiser J., Weissman C. (1983). Three regions upstream from the cap site are required for efficient and accurate transcription of the rabbit β -globin gene in mouse 3T6 cells. *Cell* **32**, 695–706.

¹ Вновь образующиеся нуклеосомы могут располагаться в соответствии с распределением метилированных оснований.

- Dynan W.S., Tjian R. (1985). Control of eukaryotic messenger RNA synthesis by sequence-specific DNA-binding proteins. *Nature* **316**, 774–778.
- Efstratiadis A. and fourteen others. (1980). The structure and evolution of the human β -globin gene family. *Cell* **21**, 653–668.
- Elgin S. (1981). DNase I hypersensitive sites of chromatin. *Cell* **27**, 413–415.
- Emerson B.M., Lewis C.D., Felsenfeld G. (1985). Interaction of specific nuclear factors with the nuclease-hypersensitive region of the chick adult β -globin gene: Nature of the binding domain. *Cell* **41**, 21–30.
- Finch J. T., Noll M., Kornberg R. D. (1975). Electron microscopy of defined lengths of chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 3320–3322.
- Fletcher C., Heintz N., Roeder R. (1987). Purification and characterization of OTF-1, a transcription factor regulating cell cycle expression of a human histone H2b gene. *Cell* **51**, 773–781.
- Foe V.E., Wilkinson L.E., Laird C.D. (1976). Comparative organization of active transcription units in *Oncopeltus fasciatus*. *Cell* **9**, 131–146.
- Garabedian M.J., Hung M.-C., Wensink P.C. (1985). Independent control elements that determine yolk protein gene expression in alternative *Drosophila* tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 1396–1400.
- Garabedian M.J., Shepherd B.M., Wensink P.C. (1986). A tissue-specific transcription enhancer from the *Drosophila* yolk protein 1 gene. *Cell* **45**, 859–867.
- Garcia J. V., Bich-Thuy L. T., Stafford J., Queen C. (1986). Synergism between immunoglobulin enhancers and promoters. *Nature* **322**, 383–385.
- Gazit B., Panet A., Cedar H. (1980). Reconstitution of deoxyribonuclease I-sensitive structure on active genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 1787–1790.
- Gedamu L., Dixon G.H. (1978). Effect of enzymatic decapping on protamine messenger RNA translation in wheat-germ S-30. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **85**, 114–124.
- Gerber-Huber S., May F.E.B., Westley B.R., Felber B.K., Hoshbach H.A., Andres A.-C., Ryffel G.U. (1983). In contrast to other *Xenopus* genes the estrogen-induced vitellogenin genes are expressed when totally methylated. *Cell* **33**, 43–51.
- Gilbert W. (1978). Why genes in pieces? *Nature* **271**, 501.
- Gilbert W. (1985). Genes-in-pieces revisited. *Science* **228**, 823–824.
- Gillies S.D., Morrison S.L., Oi V.T., Tonegawa S. (1983). A tissue-specific transcription enhancer element located in the major intron of a rearranged immunoglobulin heavy chain gene. *Cell* **33**, 717–728.
- Glickin G.C., Ruberti I., Worcel A. (1984). Chromatin assembly in *Xenopus* oocytes: In vitro studies. *Cell* **37**, 33–41.
- Grosschedl R., Birnstiel M.L. (1980). Spacer DNA upstream from the TATAATA sequence are essential for promotion of H2A histone gene transcription in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 7102–7106.
- Grosfeld G.C., de Boer E., Shewmaker C.K., Flavell R.A. (1982). DNA sequences necessary for the transcription of the rabbit β -globin gene in vivo. *Nature* **295**, 120–126.
- Groudine M., Conklin K.F. (1985). Chromatin structure and de novo methylation of sperm DNA: Implications for activation of the paternal genome. *Science* **228**, 1061–1068.
- Groudine M., Kohwi-Shigematsu T., Gelinis R., Stamatoyannopoulos G., Papayannopoulos T. (1983). Human fetal to adult hemoglobin switching: Changes in chromatin structure of the β -globin gene locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 7551–7555.
- Groudine M., Weintraub H. (1981). Activation of globin genes during chick development. *Cell* **24**, 393–401.
- Hamer D.H., Leder P. (1979). Splicing and the formation of stable RNA. *Cell* **18**, 1299–1302.
- Han S., Uvady A., Schedl P. (1985). Novobiocin blocks the *Drosophila* heat shock response. *J. Mol. Biol.* **183**, 13–29.
- Harland R.M., Weintraub H., McKnight S.L. (1983). Transcription of DNA injected into *Xenopus* oocytes is influenced by template topology. *Nature* **302**, 38–43.
- Herman R., Weymouth L., Penman S. (1978). Heterogeneous nuclear RNA-protein fibers in chromatin depleted nuclei. *J. Cell Biol.* **78**, 663–674.
- Hewish D.R., Burgoyne L.A. (1973). Chromatin substructure. The digestion of chromatin DNA at regularly spread sites by nuclear DNase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **52**, 504–510.
- Hotchkiss R.D. (1948). The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. *J. Biol. Chem.* **175**, 315–332.
- Hutchinson N., Weintraub H. (1985). Localization of DNase I-sensitive sequences to specific regions of interphase nuclei. *Cell* **43**, 471–482.
- Inana G., Piatigorsky J., Norman B., Slingsby C., Blundell T. (1983). Gene and protein structure of a β -crystallin polypeptide in murine lens: Relationships of exons and structural motifs. *Nature* **302**, 310–315.
- Jackson D.A., McCready S.J., Cook P.R. (1981). RNA is synthesized at the nuclear cage. *Nature* **292**, 552–555.
- Johnston B.H., Rich A. (1985). Chemical probes of DNA conformation: Detection of Z-DNA at nucleotide resolution. *Cell* **42**, 713–724.
- Jones K.A., Kadonaga J.T., Rosenfeld P.J., Kelly T.J., Tjian R. (1987). A cellular DNA-binding protein that activates eukaryotic transcription and DNA replication. *Cell* **48**, 79–89.
- Kantor J.A., Turner P.H., Nienhuis A.W. (1980). β Thalassemia: Mutations which affect processing of the β -globin mRNA precursor. *Cell* **21**, 149–157.
- Karin M., Haslinger A., Holtgreve H., Richards R.I., Krautner P., Westphal H.M., Beato M. (1984). Characterization of DNA sequences through which cadmium and glucocorticoid hormones induce human metallothionein-II gene. *Nature* **308**, 513–519.
- Kaslow D.C., Migeon B.R. (1987). DNA methylation stabilizes X chromosome inactivation in eutherian but not in marsupial: Evidence for multistep maintenance of mammalian X dosage compensation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 6210–6214.
- Kaye J.S., Pratt-Kaye S., Bellard M., Dretzen G., Bellard F., Chambon P. (1986). Steroid hormone dependence of four DNase I-hypersensitive regions located within the 7000-bp 5' flanking segment of the ovalbumin gene. *EMBO J.* **5**, 277–285.
- Keith D.H., Singersam J., Riggs A.D. (1986). Active X-chromosome DNA is unmethylated at eight CCGG sites clustered in a guanine-plus-cytosine-rich island at the 5' end of the gene for phosphoglycerate kinase. *Mol. Cell Biol.* **6**, 4122–4125.
- Keshet I., Lieman-Hurwitz J., Cedar H. (1986). DNA methylation affects the formation of active chromatin. *Cell* **44**, 535–543.
- Klock G., Strahle U., Schutz G. (1987). Oestrogen and glucocorticoid responsive elements are closely related but distinct. *Nature* **329**, 734–736.
- Kohwi-Shigematsu T., Kohwi Y. (1985). Poly (dG)–Poly (dC) sequences, under torsional stress, induce an altered DNA conformation upon neighboring DNA sequences. *Cell* **43**, 199–206.
- Konieczny S.F., Emerson C.P., Jr. (1984). 5-Azacytidine induction of stable mesodermal stem cell lineages from 10T1/2 cells: Evidence for regulatory genes controlling determination. *Cell* **38**, 791–800.
- Kornberg R.D., Thomas J.D. (1974). Chromatin structure: Oligomers of histones. *Science* **184**, 865–868.

- Krieg P.A., Melton D.A. (1987). An enhancer responsible for activating transcription at the mid-blastula transition in *Xenopus* development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 2331–2335.
- Kumar V., Green S., Stack G., Berry M., Jin J.-R., Chambon P. (1987). Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell* **51**, 941–951.
- Labhart P., Koller T. (1982). Structure of the active nucleolar chromatin of *Xenopus laevis* oocytes. *Cell* **28**, 279–292.
- Larsen A., Weintraub H. (1982). An altered DNA conformation detected by S1 nuclease occurs at specific regions in active chick globin chromatin. *Cell* **29**, 609–622.
- Lassar A.B., Paterson B.M., Weintraub H. (1986). Transfection of a DNA locus that mediates the conversion of 10T1/2 fibroblasts into myoblasts. *Cell* **47**, 649–656.
- Lawn R.M., Efstratiadis A., O'Connell C., Maniatis T. (1980). The nucleotide sequence of the human β -globin gene. *Cell* **21**, 647–651.
- Liskay R.M., Evans R. (1980). Inactive X chromosome DNA does not function in DNA-mediate cell transformation for the hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 4895–4898.
- Lock L.F., Takagi N., Martin G.R. (1987). Methylation of the HPRT gene on the inactive X chromosome occurs after chromosome inactivation. *Cell* **48**, 39–46.
- Logan J., Flack-Pedersen E., Darnell J.E., Jr., Shenk T. (1987). A poly(A) addition site and a downstream termination region are required for efficient cessation of transcription by RNA polymerase II in the mouse β maj-globin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 8306–8310.
- Mandel J.L., Chambon P. (1979). DNA methylation differences: Organ-specific variations in methylation pattern within and around ovalbumin and other chick genes. *Nucleic Acid Res.* **7**, 2081–2103.
- Maniatis T., Goodbourn S., Fischer J.A. (1987). Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. *Science* **236**, 1237–1245.
- Maquat L.E., Kinniburgh A.J., Beach L.R., Honig G.R., Lazerion J., Ershler W.B., Ross J. (1980). Processing of human β -globin mRNA precursor to mRNA is defective in three patients with β^+ thalassemias. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 4287–4291.
- Marbaix G., Huez G., Burny A., Cleuter Y., Hubert E., Lecle-roq M., Chantrenne H., Soreq H., Nudel U., Littauer U.Z. (1975). Absence of polyadenylate segment in globin messenger RNA accelerates its degradation in *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 3065–3067.
- Mariman E.C.M., van Eekelen C.A.G., Reinders R.J., Berns A.J.M., van Venrooij W.J. (1982). Adenoviral heterogeneous nuclear RNA is associated with the host nuclear matrix during splicing. *J. Mol. Biol.* **154**, 103–119.
- Martinez E., Givel F., Wahl W. (1987). An estrogenresponsive element as an inducible enhancer: DNA sequence requirements and conversion to a glucocorticoid-responsive element. *EMBO J.* **6**, 3719–3727.
- Mather E.L., Perry R.P. (1982). Transcriptional regulation of the immunoglobulin-V genes. *Nucleic Acid Res.* **9**, 6855–6867.
- McGhee J.D., Grindler G.D. (1979). Specific DNA methylation sites in the vicinity of the chick β -globin genes. *Nature* **280**, 419–420.
- McKnight S., Tjian R. (1986). Transcriptional selectivity of viral genes in mammalian cells. *Cell* **46**, 795–805.
- Melton D.W., McEwan C., McKie A.B., Reid A.M. (1986). Expression of the mouse HPRT gene: Deletion analysis of the promoter region of an X-chromosome linked housekeeping gene. *Cell* **44**, 319–328.
- Merkel C.G., Kwan S.-P., Lingrel J.B. (1975). Size of the poly(A) region of newly synthesized globin mRNA. *J. Biol. Chem.* **250**, 3725–3728.
- Miesfeld R. and seven others. (1986). Genetic complementation of a glucocorticoid receptor deficiency by a cloned receptor cDNA. *Cell* **46**, 389–399.
- Mohandas T., Sparkes R.S., Shapiro L.J. (1981). Reactivation of an inactive human X chromosome: Evidence for X inactivation by DNA methylation. *Science* **211**, 393–396.
- Monk M., Boubelik M., Lehnert S. (1987). Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic, and germ cell lineages during mouse embryo development. *Development* **99**, 371–382.
- Mulvihill E.R., Lepennec J.P., Chambon P. (1982). Chick oviduct progesterone receptor: Location of specific regions of high-affinity binding in cloned DNA fragments of hormone-responsive genes. *Cell* **28**, 621–632.
- Myers R.M., Tilly K., Maniatis T. (1986). Fine structure genetic analysis of a β -globin promoter. *Science* **232**, 613–618.
- Nabel G., Baltimore D. (1986). Inducibility of α immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a posttranslational mechanism. *Cell* **47**, 921–928.
- Nelson W.G., Pienta K.J., Barrack E.R., Coffey D.S. (1986). The role of the nuclear matrix in the organization and function of DNA. *Annu. Rev. Biophys. Bioph. Chem.* **15**, 457–475.
- Nickol J., Behe M.N., Felsenfeld G. (1982). Effect of the B-Z transformation in poly(dG-m⁵dC); bi-poly(dG-m⁵dC) on nucleosome formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 1771–1775.
- Nokin P., Burny A., Huez G., Marbaix G. (1976). Globin mRNA from anaemic rabbit spleen. Size of its polyadenylate segment. *Eur. J. Biochem.* **68**, 431–436.
- Noll M. (1974). Subunit structure of chromatin. *Nature* **251**, 249–251.
- Nordheim A., Pardue M.L., Lafer E.M., Moller A., Stollar B.D., Rick A. (1981). Antibodies to lefthanded Z-DNA bind to interband regions of *Drosophila* polytene chromosomes. *Nature* **294**, 417–422.
- Ohlsson H., Edlund T. (1986). Sequence-specific interactions of nuclear factors with the insulin gene enhancer. *Cell* **45**, 34–44.
- Orkin S., Kazanian H.H. (1984). The mutation and polymorphism of the human β -globin gene and its surrounding DNA. *Annu. Rev. Genet.* **18**, 131–171.
- Oudet P., Gross-Bellard M., Chambon P. (1975). Electron microscope and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell* **4**, 281–300.
- Parker C.S., Topol J. (1984). A *Drosophila* RNA polymerase II transcription factor contains a promoter region-specific DNA-binding activity. *Cell* **36**, 357–369.
- Parslow T.G., Blair D.L., Murphy W.J., Granner D.K. (1984). Structure of the 5' ends of immunoglobulin genes: A novel conserved sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 2650–2654.
- Payvar F. and seven others. (1983). Sequence-specific binding of glucocorticoid receptor to MTV DNA at sites within and upstream of the transcribed region. *Cell* **35**, 381–392.
- Pfahl M. (1982). Specific binding of the glucocorticoid-receptor complex to the mouse mammary tumor proviral promoter region. *Cell* **31**, 475–482.
- Picard D., Schaffner W. (1984). A lymphocyte-specific enhancer in the mouse immunoglobulin α gene. *Nature* **307**, 80–82.
- Pruitt S.C., Reeder R.H. (1984). Effect of topological constraint on transcription of ribosomal DNA in *Xenopus* oocytes. *J. Mol. Biol.* **174**, 121–139.
- Queen C., Baltimore D. (1983). Immunoglobulin gene transcription is activated by downstream sequence elements. *Cell* **33**, 741–748.
- Rabinow L., Dickinson W.J. (1986). Complex cis-acting regulators and locus structure of *Drosophila* tissue-specific ADH variants. *Genetics* **112**, 523–537.
- Razin A., Cedar H., Riggs A. (1984). DNA Methylation:

- Biochemistry and Biological Significance. Springer-Verlag, New York.
- Reik W., Collick A., Norris M.L., Barton S.C., Surani M.A. (1987). Genomic imprinting determines methylation of paternal alleles in transgenic mice. *Nature* **328**, 248–250.
- Reynolds G.A., Basu S.K., Osborne T.F., Chin D.J., Gil G., Brown M.S., Goldstein J.L., Luskey K.L. (1984). HMG CoA reductase: A negatively regulated gene with unusual promoter and 5' untranslated regions. *Cell* **38**, 275–285.
- Robinson S.I., Nelkin B.D., Vogelstein B. (1982). The ovalbumin gene is associated with the nuclear matrix of chicken oviduct cells. *Cell* **28**, 99–106.
- Roeder R. (1987). Transcription factors and mechanisms for growth- and developmentally-regulated genes. (Lecture at Summer Symposium in Molecular Biology, Penn State University.)
- Rogers J., Wall R. (1981). Immunoglobulin heavy chain genes: Demethylation accompanies class switching. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 7497–7501.
- Rose S., Garrard W.T. (1984). Differentiation-dependent chromatin alterations precede and accompany transcription of immunoglobulin light chain genes. *J. Biol. Chem.* **259**, 8534–8544.
- Rottman F.A., Shatkin A.J., Perry R.P. (1974). Sequences containing methylated nucleotides at the 5' termini of messenger RNAs: Possible implications for processing. *Cell* **3**, 197–199.
- Ryoji M., Worcel A. (1984). Chromatin assembly in *Xenopus* oocytes: In vitro studies. *Cell* **37**, 21–32.
- Sakano H. and seven others. (1979). Domains and the hinge region of an immunoglobulin heavy chain gene are encoded in separate DNA segments. *Nature* **277**, 627–633.
- Sapienza C., Peterson A.C., Rossant J., Balling R. (1987). Degree of methylation of transgenes is dependent of gamete of origin. *Nature* **328**, 251–254.
- Schlissel M.S., Brown D.D. (1984). The transcriptional regulation of *Xenopus* 5 S RNA genes in chromatin: The roles of active stable transcription complex and histone H1. *Cell* **37**, 903–913.
- Sellem C.H., Weiss M.C., Cassio D. (1985). Activation of a silent gene is accompanied by its demethylation. *J. Mol. Biol.* **181**, 363–371.
- Sen R., Baltimore D. (1986a). Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* **46**, 705–716.
- Sen R., Baltimore D. (1986b). Inducibility of κ immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a post-translational mechanism. *Cell* **47**, 921–928.
- Shatkin A.J. (1976). Capping of eucaryotic mRNAs. *Cell* **9**, 645–653.
- Sheiness D., Darnell J.E. (1973). Polyadenylic segment in mRNA becomes shorter with age. *Nature New Biol.* **241**, 265–268.
- Shen C.K.J., Maniatis T. (1980). Tissue-specific DNA methylation in a cluster of rabbit β -like globin genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 6634–6638.
- Shermoen A.W., Beckendorf S.K. (1982). A complex of DNAase I-hypersensitive sites near the *Drosophila* glue protein gene, *Sgs-4*. *Cell* **29**, 601–607.
- Shi Z.P., Lee R., Weinmann R. (1986). Protein factor(s) binding independently to two different regions of the adenovirus-2 major late promoter. *Nucleic Acid Res.* **14**, 3729–3744.
- Spritz R.A. and nine others. (1981). Base substitution in an intervening sequence of a β -thalassemic human globin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 2455–2459.
- Stalder J., Larsen A., Engel J.D., Dolan M., Groudine M., Weintraub H. (1980). Tissue-specific DNA cleavages in the globin chromatin domain introduced by DNase I. *Cell* **20**, 451–460.
- Staudt L.M., Singh H., Sen R., Wirth T., Sharp P.A., Baltimore D. (1986). A lymphoid-specific protein binding to the octamer motif of immunoglobulin genes. *Nature* **323**, 640–643.
- Stein R., Gruenbaum Y., Pollack Y., Razin A., Cedar H. (1982). Clonal inheritance of the pattern of methylation in mouse cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 61–65.
- Steiner E.K., Eissenbert J.C., Elgin S.C.R. (1984). A cytological approach to the ordering of events in gene activation using the *Sgs-4* locus of *Drosophila melanogaster*. *J. Cell Biol.* **99**, 233–238.
- Stewart A.D., Hunt D.M. (1982). The Genetic Basis of Development. Wiley, New York.
- Südhof T.C., Goldstein J.L., Brown M.S., Russell D.W. (1985). The LDL gene: A mosaic of exons shared with different proteins. *Science* **228**, 815–822.
- Swain J.L., Stewart T.A., Leder R. (1987). Parental legacy determines methylation and expression of an autosomal transgene: A molecular mechanism for parental imprinting. *Cell* **50**, 719–727.
- Taylor S.M., Jones P.A. (1982). Changes in phenotypic expression in embryonic and adult cells treated with 5-azacytidine. *J. Cell Physiol.* **111**, 187–194.
- Tiemeier D.C., Tilghman S.M., Polsky F.I., Seidman J.G., Leder A., Edgell M.H., Leder P. (1978). A comparison of two cloned mouse globin genes and their surrounding intervening sequences. *Cell* **14**, 237–246.
- Trudel M., Constantini F. (1987). A 3' enhancer contributes to the stage-specific expression of the human β -globin gene. *Genes and Dev.* **1**, 954–961.
- van der Ploeg L.H.T., Flavell R.D. (1980). DNA methylation in the human γ - δ - β globin locus in erythroid and non-erythroid cells. *Cell* **19**, 947–958.
- van Eekelen C.A.G., van Venrooij W.J. (1981). HnRNA and its attachment to a nuclear protein matrix. *J. Cell Biol.* **88**, 554–563.
- Villeponteau B., Lundell M., Martinson H. (1984). Torsional stress promotes the DNase hypersensitivity of active genes. *Cell* **39**, 469–478.
- Vogel G., Ohkubo H., Sobel M.E., Yamada Y., Pastan I., de Cromburghe B. (1981). Structure of the promoter for chicken type I collagen gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 5334–5338.
- Walker M.D., Edlund T., Boulet A.M., Rutter W.J. (1983). Cell-specific expression controlled by the 5' flanking region of the insulin and chymotrypsin genes. *Nature* **306**, 557–561.
- Wang A.H.J., Quigley G.J., Kolpack F.J., Crawford J.L., vanBoom J.H., van der Marel G., Rich A. (1979). Molecular structure of a left-handed double helical DNA fragment at atomic resolution. *Nature* **282**, 680–686.
- Wasylyk B., Kedinger C., Corden J., Brison D., Chambon P. (1980). Specific in vitro initiation of transcription on ovalbumin and ovalbumin genes and comparison with adenovirus 2 early and late genes. *Nature* **285**, 367–373.
- Weintraub H. (1984). Histone H1-dependent chromatin superstructures and the suppression of gene activity. *Cell* **38**, 17–27.
- Weintraub H. (1985). Assembly and propagation of repressed and derepressed chromosomal states. *Cell* **42**, 705–711.
- Weintraub H., Groudine M. (1976). Chromosomal subunits in active genes have an altered configuration. *Science* **193**, 848–856.
- Weisbrod S., Groudine M., Weintraub H. (1980). Interaction of HMG 14 and 17 with actively transcribing genes. *Cell* **19**, 289–301.
- Weisbrod S., Weintraub H. (1979). Isolation of a subclass of nuclear proteins responsible for conferring a DNase I-sensitive structure on globin chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 630–634.

- Wigler M., Levy D., Perucho M. (1981). The somatic replication of DNA methylation. *Cell* **24**, 33–40.
- Wirth T., Staudt L., Baltimore D. (1987). An octamer oligonucleotide upstream of a TATA motif is sufficient for lymphoid-specific promoter activity. *Nature* **329**, 174–178.
- Wolf S.F., Dintzis S., Toniolo D., Persico G., Lunnen K.D., Axelmann J., Migeon B.R. (1984). Complete concordance between glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and hypomethylation of 3' CpG clusters: Implication for X chromosome dosage compensation. *Nucleic Acid Res.* **12**, 9333–9348.
- Wolf S.F., Jolly D.J., Lunnen K., Fridmann T., Migeon B.R. (1982). Methylation of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase locus on the human X chromosome: Implications for X-chromosome inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 2806–2810.
- Wolf S.F., Migeon B.R. (1984). Clusters of CpG dinucleotides implicated by nuclease sensitivity as control elements of housekeeping genes. *Nature* **314**, 467–469.
- Workman J.L., Roeder R.G. (1987). Binding of transcription factor TFIID to the major late promoter during in vitro nucleosome assembly potentiates subsequent initiation by RNA polymerase II. *Cell* **51**, 613–622.
- Zaret K.S., Yamamoto K.R. (1984). Reversible and persistent changes in chromatin structure accompany activation of a glucocorticoid-dependent enhancer element. *Cell* **38**, 29–38.
- Zheng X.-M., Moncollin V., Egly J.M., Chambon P. (1987). A general transcription factor forms a stable complex with RNA polymerase B (II). *Cell* **50**, 361–368.

Глава 13

Контроль развития на уровне процессинга РНК

Возможно, что новые концепции, возникшие при изучении микроорганизмов, будут весьма полезны при интерпретации и анализе дифференцировки... Однако в конечном итоге дифференцировку следует изучать на примере дифференцированных клеток.

Ж. МОНО и Ф. ЖАКОБ (1961)

*Между идеей
и творением...
Между силой
и жизнью
Между парением
и падением
Опускается тень.*

Т. ЭЛИОТ (1936)

Введение

Сущность дифференцировки заключается в продукции различных наборов белков в клетках разных типов. У бактерий дифференциальная экспрессия генов может контролироваться на уровнях транскрипции, трансляции и деградации белков. У эукариот существует еще один возможный уровень регуляции, а именно контроль на уровне процессинга РНК. В настоящей главе будут представлены некоторые новые данные, указывающие на то, что этот тип регуляции имеет решающее значение для развития и что различные клетки могут осуществлять процессинг одних и тех же транскрибированных РНК различными способами, создавая таким образом разные популяции цитоплазматических мРНК из одинаковых наборов ядерных транскриптов.

В шестидесятых годах биологи развития явно склонялись к объяснению дифференцировки на основе транскрипционной регуляции экспрессии генов. Во-первых, изучение политемных хромосом и их продуктов в ходе развития насекомых свидетельствовало о том, что и в самом деле регуляция на уровне транскрипции имеет место. Во-вторых, опыты по ДНК-РНК-гибридизации показали, что, несмотря на идентичность ДНК в клетках различных типов, РНК-продукты в этих клетках различаются (McCarthy, Hoyer, 1964). В-третьих, экспрессию генов было проще изучать на бактериях, чем на клетках эукариот, и это исследование продемон-

стрировало важность регуляции на уровне транскрипции в формировании различных физиологических состояний клеток *Escherichia coli*. Например, *lac*-оперон *E. coli* способен транскрибировать мРНК только в присутствии молекулы определенного индуктора (в данном случае лактозы). Это представлялось убедительной аналогией дифференциальной экспрессии генов в клетках эукариот.

Гетерогенная ядерная РНК

Однако вскоре стало ясно, что мРНК не является первичным продуктом транскрипции. Существует **ядерная РНК (яРНК)**, которая по размерам намного больше, чем мРНК, и которая характеризуется существенно более коротким временем полужизни, чем цитоплазматические мРНК. Из-за большого разнообразия в размерах эти молекулы были названы **гетерогенной ядерной РНК (гяРНК)**. Молекулы гяРНК имеют длину приблизительно $5-19 \cdot 10^3$ нуклеотидов, тогда как размеры мРНК составляют обычно $2 \cdot 10^3$ оснований, и распадаются с периодом полужизни, измеряемым минутами вместо часов, как для мРНК (см. обзор Lewin, 1980). У зародышей морского ежа период полужизни мРНК составляет около 5 ч, а период полужизни ядерной РНК — около 20 мин. Взаимоотношение между гетерогенной ядерной РНК и цитоплазматической мРНК оставалось

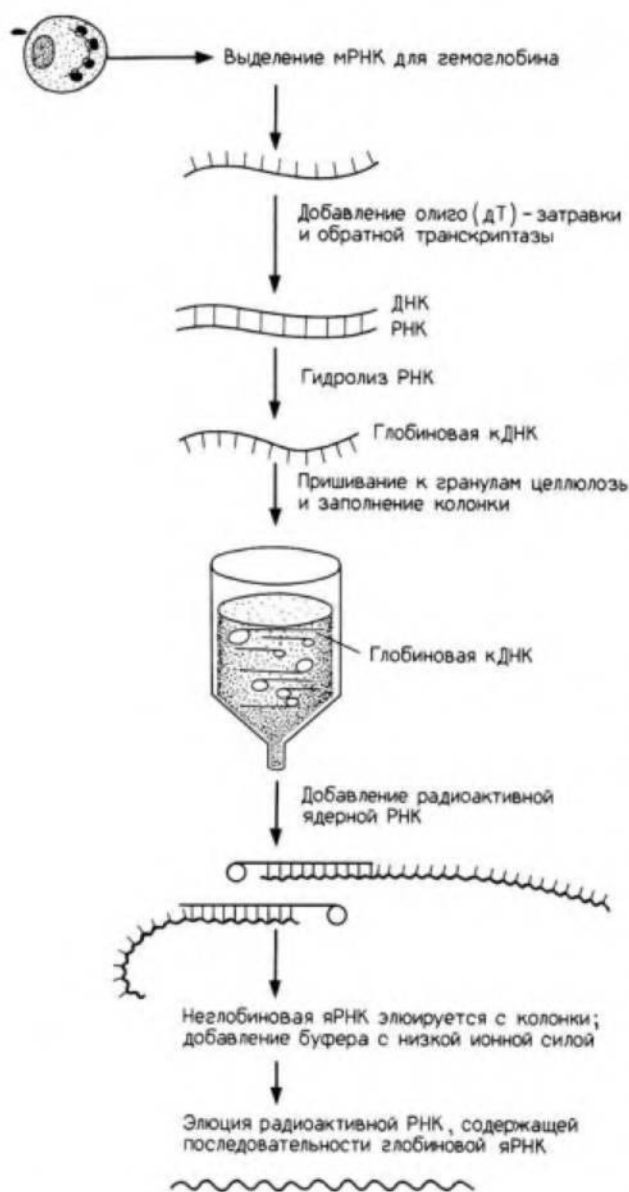


Рис. 13.1. Схема выделения ядерной РНК (яРНК), содержащей последовательности, кодирующие глобины.

предметом споров до 1977 г., когда в нескольких лабораториях в составе больших молекул ядерной РНК¹ были обнаружены последовательности мРНК.

¹ Термины *ядерная РНК* (яРНК) и *гетерогенная ядерная РНК* (гяРНК) часто используются как синонимы, однако на самом деле они несколько различаются по значению. Термин гяРНК относится обычно к предшественникам мРНК (называемым иногда пре-мРНК), тогда как яРНК относится к общей нефракционированной РНК, экстрагированной из ядра. Мы будем использовать обозначение яРНК, а не гяРНК.

Исследователи (Bastos, Aviv, 1977) изолировали глобиновую мРНК мыши и получили к ней комплементарную ДНК (кДНК) с помощью обратной транскриптазы (рис. 13.1). Затем эту кДНК пришили к гранулам целлюлозы. В присутствии радиоактивного уридина были выращены гемоглобинсинтезирующие клетки. Из этих клеток экстрагировали радиоактивную РНК и пропустили ее через приготовленную колонку. Все РНК-последовательности, кодирующие глобины, должны были связаться на колонке. Никакие другие РНК-последовательности не могут быть «выловлены» подобным образом. Связавшуюся РНК экстрагировали, промывая колонку растворами с низкой ионной силой, которые разрывают связи, удерживающие комплементарные молекулы друг с другом. Если клетки метили в течение 5 мин, то большая часть радиоактивной РНК, связавшейся на колонке, характеризовалась коэффициентом седиментации 27 S, а размеры ее составляли около 5000 нуклеотидов (приблизительно в восемь раз длиннее, чем цитоплазматическая глобиновая мРНК).

Однако если мечение останавливали, а РНК экстрагировали 5 минутами позже, то глобиновые последовательности обнаруживали в меньшей по размерам фракции – 15 S. Окончательно кодирующие глобины РНК выявлялись как 10S-последовательности (600 нуклеотидов), характерные для цитоплазматической мРНК. Таким образом, гетерогенная ядерная РНК содержит предшественники цитоплазматической глобиновой мРНК. Другая группа исследователей (Hames, Perry, 1977) получила сходный результат, когда использовала кДНК ко всей популяции мРНК из культивируемых клеток мыши: кДНК-зонд связывался с гигантскими последовательностями гетерогенной ядерной РНК. Следовательно, эукариотическая ДНК транскрибирует большие ядерные РНК, которые служат предшественниками для меньших цитоплазматических мРНК.

Сложность ядерной и цитоплазматической РНК

Следующий вопрос касается числа различных типов последовательностей РНК, присутствующих в ядре и цитоплазме. Содержится ли в ядре большее разнообразие последовательностей, чем в цитоплазме, или и там, и там разнообразие последовательностей примерно одинаковое? Ответ на этот вопрос покажет нам, какая часть генома транскрибируется в яРНК и насколько адекватно можно судить об этой части по набору мРНК. Разнообразие нуклеотидных последовательностей называют **сложностью**. Для измерения сложности определенное количество радиоактивной РНК добавляют к избытку денатурированной ДНК и дают им возможность ренатурировать. Чем выше сложность РНК,

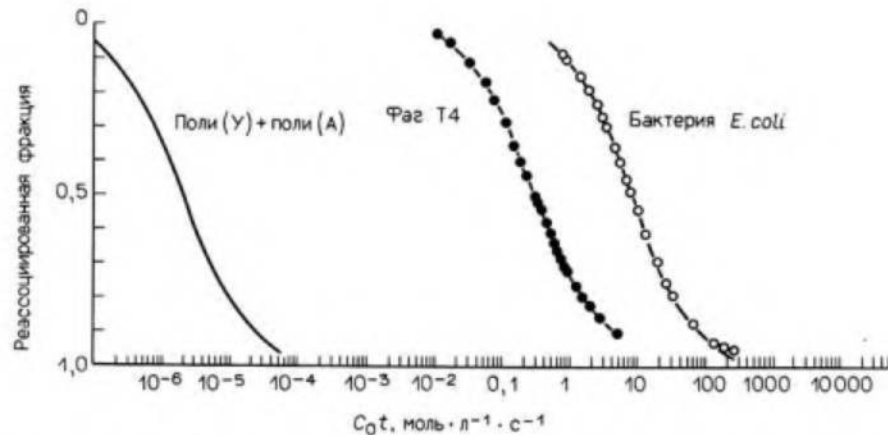


Рис. 13.2. Реассоциация нуклеиновых кислот различного происхождения. Каждая кривая представляет нормальную кинетику, ожидаемую в том случае, когда все гены присутствуют с одинаковой частотой. Так как для реакции гибридизации необходима встреча двух комплементарных последовательностей, скорость гибридизации может быть описана как $dC/dt = -kC^2$, где C — концентрация одноцепочечных последовательностей в момент времени t , а k — константа реассоциации. Обратите внимание, что 0% соответствует верхнему значению оси ординат, а ось C_0t представлена логарифмической шкалой. Видно, что ДНК *E. coli* содержит примерно в 100 раз больше последовательностей, чем ДНК бактериофага Т4. (По Britten, Kohne, 1968.)

тем ниже скорость ее ренатурации с ДНК. Другими словами, если присутствует только один тип РНК (сложность = 1), то эта РНК-последовательность довольно быстро распределяется в реакционной смеси, найдя свой ДНК-гомолог. Однако если это же количество РНК содержит тысячу последовательностей (сложность = 1000), то каждая индивидуальная последовательность будет в тысячу раз более разбавленной и вероятность найти свой гомолог за

то же самое время будет крайне мала. Двухцепочечные ДНК-РНК-гибриды можно легко отделить от негибридизованной РНК и затем вычислить долю радиоактивной РНК, которая нашла себе комплементарную ДНК.

Определение сложности обычно представляют графически в виде кривых C_0t , причем C_0 — исходная концентрация меченой нуклеиновой кислоты (в молях на 1 л), t — время (в секундах). Степень реассо-

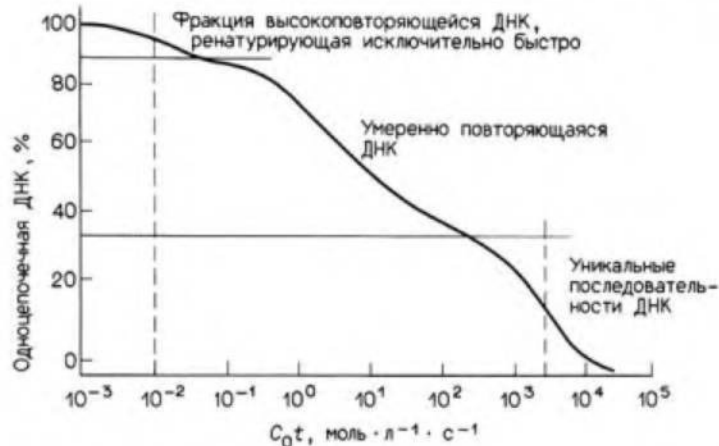


Рис. 13.3. Реассоциация ДНК типичного эукариотического организма. ДНК разрезают до коротких фрагментов — около 500 пар оснований — и денатурируют в щелочи с целью получения отдельных цепей. Затем снижают значение pH, позволяя цепям ДНК ренатурировать. Кривая показывает быстро ренатурирующую фракцию, которая представляет высокоповторяющиеся последовательности ДНК, фракцию умеренно повторяющейся ДНК и фракцию уникальных последовательностей ДНК. Показанные на рисунке высокоповторяющиеся последовательности представлены с примерно в миллион раз большей частотой, чем уникальные гены. Высокоповторяющаяся ДНК локализована обычно в центромерах и выполняет структурную функцию. Уникальная ДНК включает в себя гены, такие, как гены ферментов и структурных белков. Умеренно повторяющаяся ДНК, как полагают, содержит регуляторные последовательности, обнаруживаемые в интронах и в 5'- и 3'-фланкирующих областях генов. (По Hood et al., 1975.)

циации должна быть функцией концентрации и времени. Поэтому долю ренатурированной РНК в процентах наносят на график относительно значения C_0t (рис. 13.2). Опыты такого типа были проведены как с ДНК, так и с РНК; результаты показали, что некоторые последовательности ДНК представлены в геноме миллионы раз (фракция высокоповторяющихся последовательностей), некоторые последовательности представлены тысячами раз (фракция умеренных повторов) и, наконец, некоторые ДНК (такие, как гены, кодирующие ферменты) представлены единственной копией на гаплоидный геном (рис. 13.3) (Britten, Kohne, 1968).

Определенная с помощью этого метода сложность яРНК оказалась существенно большей, чем сложность мРНК из тех же клеток. Во-первых, определенные последовательности яРНК ассоциировали с ДНК очень быстро. Это означает, что они содержат РНК, транскрибированную с повторяющихся последовательностей ДНК. Цитоплазматическая мРНК из клеток бластулы морского ежа не содержит последовательности, которые гибридизуются с ДНК-повторами, тогда как приблизительно 25% яРНК, разрезанной на фрагменты размером около 1100 нуклеотидов, ассоциируют с ДНК при низких значениях C_0t . Исходя из того, что у морского ежа средняя длина повторов в яРНК составляет примерно 300 оснований, можно получить оценку, согласно которой 70% молекул яРНК содержат по крайней мере одну повторяющуюся последовательность (Smith et al., 1974). В том случае, если РНК гибридизовали с очищенной неповторяющейся (уникальной) ДНК (чтобы повторы не усложняли картину гибридизации), сложность яРНК обычно в 4–20 раз превосходила сложность мРНК из того же органа или типа клеток (табл. 13.1). По оценкам, полученным в таких работах, у зародышей

Таблица 13.1. Примерные кинетические характеристики и относительная сложность популяций мРНК и яРНК у различных видов

Организм	Доля яРНК, переходящая в поли(А) ⁺ -содержащую мРНК	
	от исходной массы, %	от исходной сложности, %
<i>Drosophila</i>	14–20	28–40
<i>Aedes</i> (комар)	~3	~13
Морской еж	4–7	17–29
Клетки карциномы человека (клетки HeLa)		
в культуре	3–6	15–30

Источник: Lewin (1980).

морского ежа только 10–20% яРНК входят в популяцию цитоплазматических мРНК. В печени крысы только 11% типов последовательностей яРНК становятся информационными РНК, а в культивируемых клетках насекомых эта оценка снижается до 5%. На основе приведенных данных можно прийти к выводу, что ядерные транскрипты содержат: 1) небольшую фракцию гЯРНК, которая является предшественником мРНК клетки; 2) большую фракцию яРНК, которая очень быстро обменивается внутри ядра. Популяция молекул яРНК содержит многочисленные последовательности, отличающиеся от тех, которые проходят процессинг в мРНК.

Контроль развития на уровне процессинга яРНК

Из предыдущего раздела мы узнали, что в геноме транскрибируется намного больше последовательностей по сравнению с теми, которые становятся мРНК. Этот вывод предполагает, что контроль дифференцировки может эффективно осуществляться после транскрипции путем дифференциального процессинга предшественников специфических мРНК. Недавние исследования на морском еже и крысе подтвердили это.

Из клеток бластулы морского ежа была получена уникальная ДНК с помощью денатурации ДНК и выделения фракции, которая не реассоциировала при значении C_0t , равном 200 (Kleene, Humphreys, 1977). Ядерная РНК из клеток бластулы связывала 15% этой ДНК. Сходным образом яРНК со стадии плутеуса также связывала только 15% этой ДНК, даже если ее добавляли в большом избытке. Поскольку только одна цепь ДНК комплементарна РНК, 15% гибридизованной ДНК соответствуют 30% генома. Следовательно, около 30% генома активно транскрибируют яРНК на стадии бластулы и около 30% генома активно транскрибируют яРНК на стадии плутеуса. Одинаковы ли эти два набора последовательностей ДНК? Ответ на этот вопрос был получен в опытах, в которых ядерные РНК со стадий бластулы и плутеуса смешивали и затем добавляли их смесь к денатурированной уникальной ДНК. Если эти последовательности отличаются полностью, то следует ожидать, что свяжется 30% ДНК (т.е. 60% генома будут кодировать совместный набор мРНК для бластулы и плутеуса). Если они идентичны, то следует ожидать, что свяжется 15% ДНК. Полученные результаты представлены на рис. 13.4. Смесь связывала только 15% ДНК. Последовательности яРНК бластулы и плутеуса присоединялись к одной и той же ДНК. В пределах ошибки эксперимента можно считать, что популяции яРНК в клетках бластулы и плутеуса идентичны.

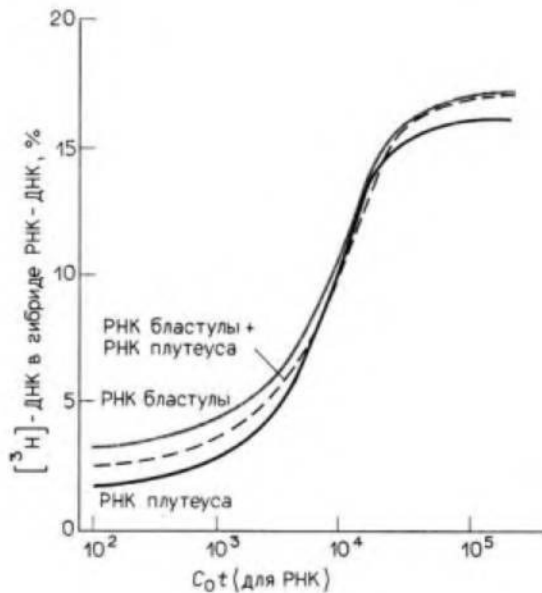


Рис. 13.4. Гибридизация ядерной РНК с уникальной $[^3\text{H}]$ -ДНК. Радиоактивную уникальную ДНК смешивали с РНК бластулы, РНК плутеуса или со смесью РНК бластулы и плутеуса. Смеси инкубировали в условиях, обеспечивающих гибридизацию всех комплементарных последовательностей. Во всех трех случаях с РНК гибридизовалось около 15% ДНК. (По Kleene, Humphreys, 1977.)

Чтобы проверить это неожиданное наблюдение, те же исследователи (Kleene, Humphreys, 1977, 1985) выделили радиоактивную уникальную ДНК и смешивали ее с РНК бластулы или плутеуса при высоком значении C_0t (чтобы все последовательности ДНК могли присоединить РНК в случае, если комплементарные к ним последовательности РНК имелись в реакции). Затем они выделили те фрагменты ДНК, которые не связались с яРНК бластулы (бластула-нуль-ДНК), и те фрагменты ДНК, которые не связались с яРНК плутеуса (плутеус-нуль-ДНК). Когда бластула-нуль-ДНК денатурировали и смешали с новыми порциями яРНК плутеуса и когда плутеус-нуль-ДНК смешали с яРНК бластулы, гибридизации выше фоновых значений не наблюдалось (рис. 13.5). Таким образом, последовательности ДНК, транскрибируемые на стадии бластулы, действительно идентичны последовательностям ДНК, транскрибируемым на стадии плутеуса.

Некоторые наиболее убедительные данные, свидетельствующие о контроле за развитием на уровне процессинга, были получены в лаборатории Э. Дэвидсона и Р. Бриттена. Эти авторы впервые обнаружили, что у морского ежа *Strongylocentrotus purpuratus* в ходе развития сложность мРНК прогрессивно уменьшается (Galau et al., 1976). мРНК ооцита связывает приблизительно 4,5% генома и имеет слож-

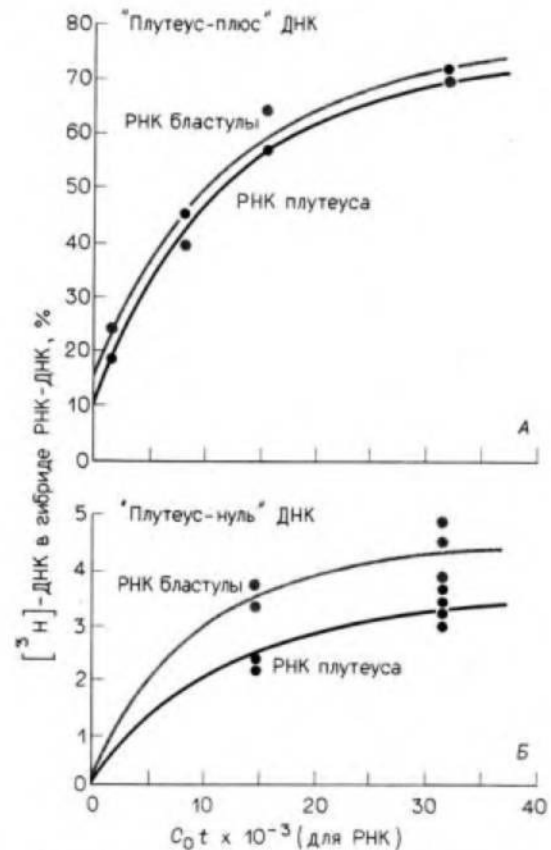


Рис. 13.5. Гибридизация «плутеус-плюс» ДНК и «плутеус-нуль» ДНК с РНК плутеуса и бластулы. А. РНК плутеуса и РНК бластулы связывают одинаковые количества «плутеус-плюс» ДНК. Б. Ни одна из этих РНК не связывает существенного количества «плутеус-нуль» ДНК. (По Kleene, Humphreys, 1977.)

ность (измеренную по C_0t) около 37 000 000 оснований. При средней длине мРНК в 2000 оснований это соответствует приблизительно 18 500 различным видам информационных РНК. мРНК бластулы связывает только 3,1% генома и представляет около 13 000 видов мРНК, а мРНК гастролы связывает всего лишь 2,0% ДНК и имеет 8000 видов мРНК. После завершения дифференцировки тканей каждая из них содержит около 6000 видов мРНК, которые гибридизуются только с 0,75% генома (рис. 13.6). Таким образом, часть генома, которая экспрессируется в цитоплазматическую мРНК, постепенно уменьшается.

Следующий вопрос, которым задались исследователи: не вызвано ли такое уменьшение изменениями в транскрипции генома? Другими словами, не уменьшается ли сходным образом разнообразие яРНК? Для ответа на этот вопрос была выделена мРНК бластулы, которую гибридизовали с денатурированной радиоактивной ДНК (Wold et al., 1978).

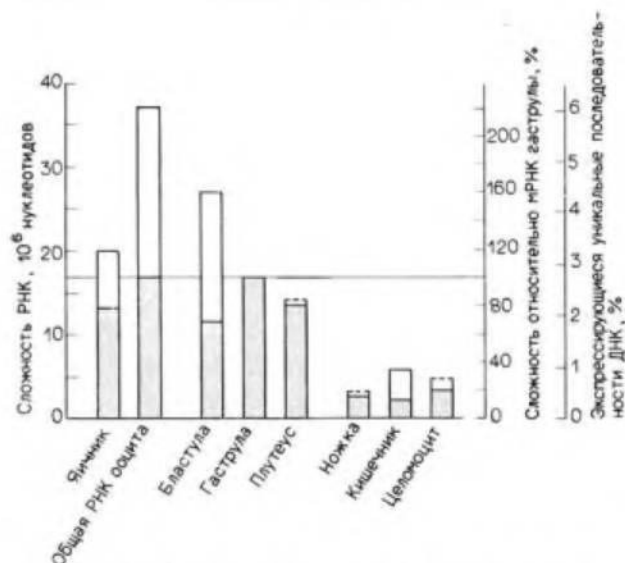


Рис. 13.6. Наборы структурных генов, представленные своими мРНК, в различных тканях морского ежа. Закрашенная часть каждого столбца соответствует фракции мРНК данной ткани, которая идентична мРНК гастрюлы. Незакрашенная часть столбца соответствует фракции мРНК, которая отличается от мРНК гастрюлы. Сложность указана на оси ординат тремя различными способами; горизонтальная черта соответствует 100% сложности мРНК гастрюлы. (По Galau et al., 1976.)

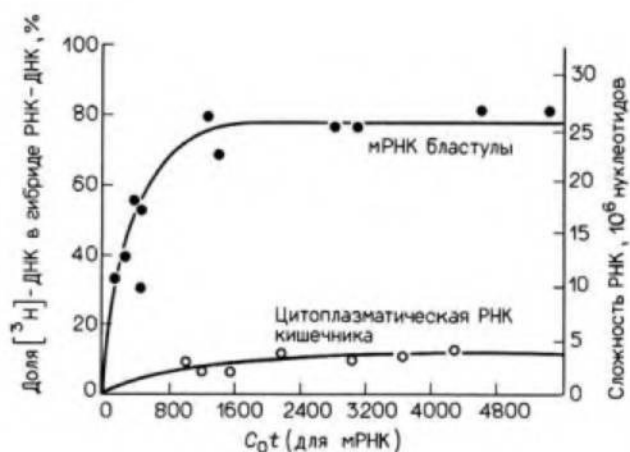


Рис. 13.7. Специфичность мДНК бластулы у морского ежа. Гибридизация мДНК (кДНК для мРНК бластулы) с мРНК бластулы и цитоплазматической РНК кишечника. (По Wold et al., 1978.)

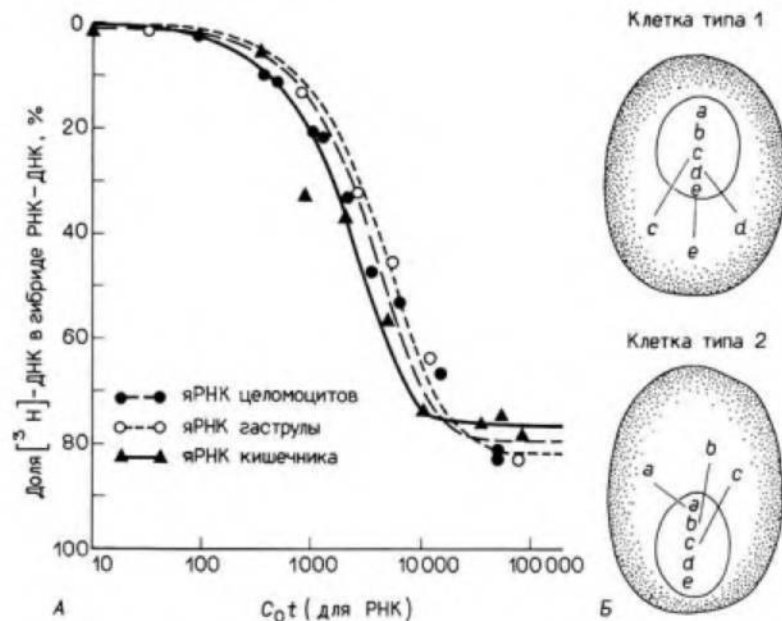


Рис. 13.8. Идентичность (в пределах точности экспериментов) ядерной РНК из дифференцированных тканей морского ежа. А. Гибридизация мДНК бластулы с ядерной РНК кишечника, целоцитов и гастрюлы. Смеси для гибридизации инкубировали при значениях C_0t достаточно высоких, чтобы обеспечить спаривание всех комплементарных последовательностей. Все последовательности бластулы были обнаружены в каждой популяции ядерных РНК, но не среди цитоплазматических РНК (рис. 13.7). Б. Схематическое изображение модели, основанной на дифференциальном процессинге РНК. В клетках обоих типов транскрибируются одинаковые наборы РНК (a, b, c, d, e), но процессинг в цитоплазму в клетках одного типа проходят последовательности c, d и e, а в клетках другого типа – последовательности a, b и c. (А – из Wold et al., 1978.)

Таблица 13.2. Сравнение тканей по последовательностям структурных генов, представленным в мРНК и яРНК

Источник кДНК-зонда	Нормированная реакция с гомологичной мРНК		Нормированная реакция с гетерологичной мРНК		Нормированная реакция с яРНК	
	мРНК	%	мРНК	%	яРНК	%
<i>Морской еж</i> мРНК бластулы (уникальная ДНК)	Бластула	100	Кишечник Целомоциты	12 13	Кишечник Целомоциты	97 101
<i>Мышь</i> мРНК мозга (общая кДНК)	Мозг	100	Почки	78	Почки	102
мРНК мозга (кДНК, представ- ляющая редкие мРНК)	Мозг	100	Почки	56	Почки	100

Источник: Davidson, Britten, 1979.

Полученные гибриды элюировали, денатурировали и отделили ДНК от связавшейся с ней РНК. Таким способом был получен ДНК-зонд, который узнает последовательности мРНК бластулы. Эта ДНК обладала высокой специфичностью в отношении последовательностей мРНК бластулы (рис. 13.7): около 78% такой «ДНК бластулы» могли связаться с мРНК бластулы, тогда как с мРНК кишечника взрослой особи могли связаться менее 10% этой ДНК.

Затем эту «мДНК бластулы» использовали для идентификации последовательностей мРНК бластулы в препаратах РНК из различных дифференцированных тканей. Полученные результаты представлены на рис. 13.8 и в табл. 13.2. Последовательности мРНК бластулы были обнаружены в РНК из всех трех использованных в эксперименте тканей взрослых особей. Около 80% мДНК бластулы гибридизовались с яРНК гастролы, кишечника и целомоцитов. Таким образом, только 10% зонда, узнающего

мРНК бластулы, будут взаимодействовать с мРНК кишечника, но около 80% этого зонда будут взаимодействовать с ядерной РНК кишечника. Поскольку контрольный опыт (гибридизация мДНК бластулы с мРНК бластулы) также дает величину 75–80%, выясняется, что *все* последовательности мРНК бластулы присутствуют среди транскриптов яРНК во всех ядрах клеток кишечника, целомоцитов и клеток гастролы, несмотря на отсутствие этих мРНК в цитоплазме. Ядро транскрибирует специфические для бластулы последовательности даже в дифференцированных целомоцитах и клетках кишечника. Итак, представляется вероятным, что контроль экспрессии генов у морского ежа осуществляется преимущественно на уровне процессинга РНК. Помимо этого аналогичные эксперименты на крысах и мышах свидетельствуют о практически полной идентичности ядерных РНК из мозга, печени и почки (Chikaraishi et al., 1978).

Дополнительные сведения и гипотезы

Механизмы специфического процессинга ядерных РНК

В 1979 г. Дэвидсон и Бриттен предложили модель дифференцировки, основанную на специфическом процессинге ядерных предшественников мРНК. Это довольно гипотетичная модель, и она продолжает оставаться объектом горячих споров. Хотя в этой модели сохранены элементы транскрипционной регуляции, она прямо декларирует независимость биологии развития от моделей «по образцу клеток *coli*», где экспрессия генов контролируется почти исключительно на уровне дифференциальной транскрипции.

Согласно этой модели, молекулы мРНК делятся на три класса в зависимости от их сложности:

1. *Класс сложных (уникальных) мРНК.* 1–15 копий на клетку. Различных видов мРНК этого класса достаточно для кодирования более 10^4 разных белков.
2. *Умеренно повторяющиеся мРНК.* 15–300 копий на клетку. Различных видов мРНК этого класса достаточно для кодирования 500–1000 различных белков.
3. *Избыточные (высокоповторяющиеся) мРНК.*

Этот вид мРНК обнаруживается в дифференцированных клетках, синтезирующих белки какой-либо одной группы. В одной клетке может содержаться от 10^4 до 10^5 копий. Например, клетки яйцевода кур-несушек содержат $1,0-1,5 \cdot 10^5$ молекул овальбуминовой мРНК. Ретикулоциты мыши и курицы содержат соответственно $4 \cdot 10^4$ и $1,5 \cdot 10^5$ молекул глобиновых мРНК на клетку. мРНК кольца Бальбиани 2 из клеток слюнных желез *Chironomus tentans* является еще одним представителем этого класса избыточных мРНК.

Большая часть данных, свидетельствующих о регуляции на уровне транскрипции, получена для класса избыточных мРНК (так как их проще всего очистить и изучить). Однако они могут представлять собой исключение. Обычно эти мРНК кодируют белки, характеризующие определенную клетку, и поэтому представляют конечную стадию дифференцировки, а не ее первопричину. Например, эритроцит проходит долгий путь дифференцировки, прежде чем достигнет стадии, когда начинает синтезироваться глобин. Из предыдущего раздела мы узнали, что последовательности мРНК, специфические для конкретной клетки, можно обнаружить в яРНК клеток всех типов. В табл. 13.2 суммированы некоторые из этих данных. Для уникальных последовательностей РНК, кодирующих белки, характерна цитоплазматическая, а не ядерная специфичность. Противоположная ситуация наблюдается для повторяющихся последовательностей РНК. Транскрипты с умеренно повторяющихся генов не обнаруживаются в мРНК морского ежа, тем не менее внутри ядра проявляется клеточная специфичность в отношении этих последовательностей! В ядерных РНК морского ежа, культивируемых клеток человека и клеток асцитной опухоли крысы повторяющиеся последовательности перемешаны с уникальными (напоминая этим последовательности ДНК). Было обнаружено, что в яРНК зародышей морского ежа имеются специфические РНК-повторы, представленные на различных стадиях развития. Более того, эти повторы в яРНК были представлены обеими комплементарными цепями.

Дэвидсон и Бриттен использовали эти данные для построения своей модели экспрессии генов. Во-первых, они предположили, что уникальные гены, которые образуют классы сложных и умеренно повторяющихся мРНК, транскрибируются постоянно с одной и той же скоростью в клетках всех типов. Во-вторых, экспрессия генов регулируется путем определения количества каждого предшественника мРНК, который подвергается процессингу и поступает в цитоплазму. В-третьих, внутриядерные дуплексы РНК-РНК, образуемые комплементарными

повторяющимися транскриптами, определяют, какой предшественник мРНК претерпит процессинг. Образование дуплексов в клетках данного типа зависит от внутриядерной концентрации специфических повторов яРНК.

Модель регуляции Дэвидсона и Бриттена представлена на рис. 13.9. «Конститутивная единица транскрипции» (KET) транскрибируется постоянно в клетках всех типов. В результате синтезируется конститутивный транскрипт (КТ), состоящий из кодирующей белок РНК (включая интроны и фланкирующие последовательности) и последовательностей с промежуточной повторяющейся ДНК. В другой области генома находятся «интегрирующие регуляторные единицы транскрипции» (ИРЕТ), которые не содержат структурных генов и транскрибируются специфическим для клеток образом¹. Эти гены содержат последовательность ДНК (сенсор), которая может включить ИРЕТ в ответ на какой-то конкретный сигнал. ИРЕТ содержит специфические ДНК-повторы и транскрибируется, обеспечивая клетку специфическими интегрирующими регуляторными транскриптами (ИРТ). Между повторами из КТ и комплементарными повторами из ИРТ образуются дуплексы РНК-РНК. Эти дуплексы требуются для сохранения и процессинга яРНК. Если двухцепочечные участки не образуются, то яРНК подвергается гидролизу нуклеазами. Если дуплексы формируются, то яРНК сохраняется, чтобы пройти процессинг и стать мРНК.

Существует множество вариаций на эту тему. Одна из интересных гипотез заключается в том, что активация ИРЕТ может быть эквивалентом того, что принято называть детерминацией. Чтобы ген экспрессировался, требуется активировать как специфический ген (KET), так и ИРЕТ. Если ген не экспрессируется постоянно, необходим двухступенчатый процесс: активация транскрипции структурного гена и активация транскрипции ИРЕТ. Первая активация может представлять детерминацию, тогда как вторая активация будет вызывать экспрессию гена и дифференцировку. В этом случае детерминация клетки может повлечь за собой дифференцировку ядра.

¹ Мы вновь видим специфическую для клеток дифференциальную транскрипцию, хотя в этой модели постулируется дифференциальная транскрипция специфических для ядер повторяющихся последовательностей, а не генов, кодирующих белки. Вся дифференцировка возвращается в конце концов к активации специфических генов компонентами цитоплазмы ооцитов или внешними факторами (что, возможно, справедливо для плода млекопитающих).

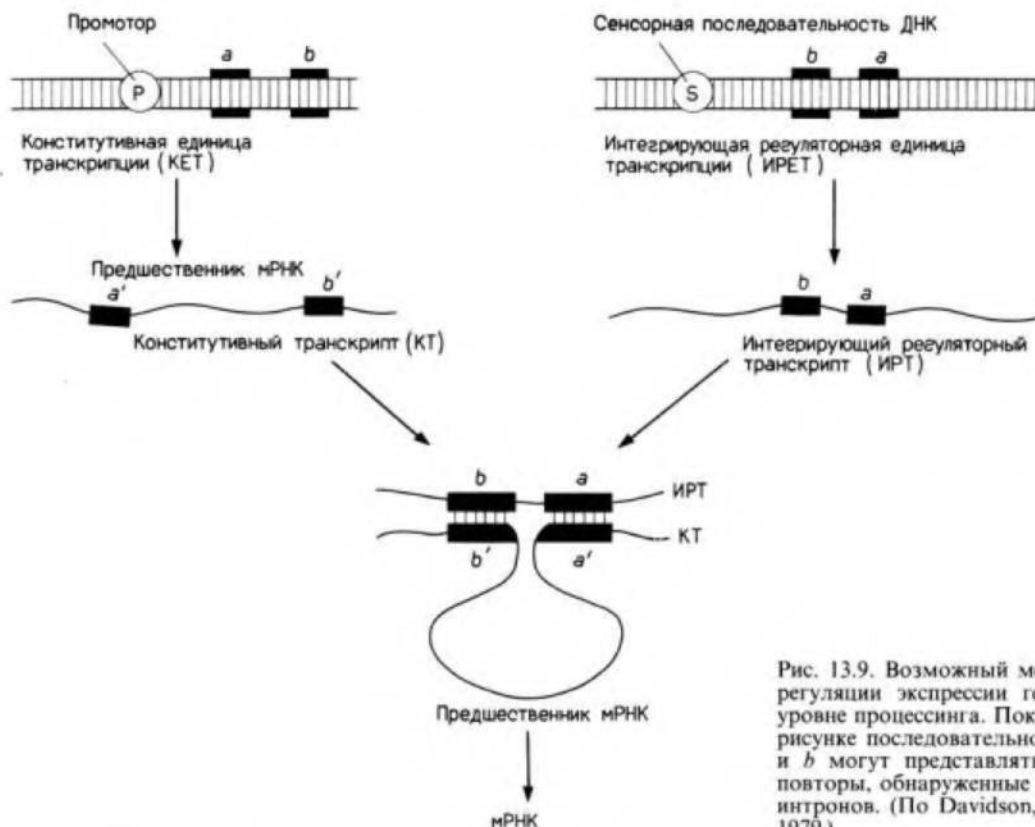


Рис. 13.9. Возможный механизм регуляции экспрессии генов на уровне процессинга. Показанные на рисунке последовательности *a* и *b* могут представлять собой повторы, обнаруженные в областях интронов. (По Davidson, Britten, 1979.)

Присутствие в ядре предшественников мРНК, не прошедших процессинг

Данные, полученные на морском еже, свидетельствуют, что популяции яРНК в различных дифференцированных клетках идентичны, поэтому можно ожидать, что зонды для мРНК, специфичных для одного типа клеток, будут находить комплементарные последовательности в ядрах из неэкспрессирующих клеток. С помощью кДНК глобиновой мРНК были обнаружены предшественники глобиновой мРНК в общей клеточной РНК из печени, мозга и культивируемых клеточных линий мыши (Humphries et al., 1976), а также в яРНК из неиндуцированных клеток больных эритролейкозом Френда (Gottesfeld, Partington, 1977) и из ооцитов *Xenopus* (Perlman et al., 1977). Слабая транскрипция овальбуминовых генов была обнаружена в печени, селезенке, мозге и сердце курицы (Axel et al., 1976; Tsai et al., 1979). Ее уровень соответствует приблизительно одной молекуле, кодирующей овальбумин, на каждые два клеточных ядра; даже те РНК, которые, как известно, регулируются на уровне транскрипции,

можно обнаружить в очень небольших количествах в ядрах клеток другой специфичности.

Некоторые из наиболее убедительных данных, свидетельствующих о контроле транскриптов РНК на уровне процессинга, получены в экспериментах с вирусами клеток мыши. В этом случае сплайсинг яРНК с образованием конкретных мРНК может осуществляться в клетках одних типов и не может в других. Вирус полиомы и вакуолизирующий обезьяний вирус 40 (SV40) инфицируют клетки и интегрируются в хозяйские хромосомы. При этом они синтезируют свою собственную РНК, которая продуцирует вирусоспецифические белки. Подобно РНК клетки хозяина, транскрипты вирусов полиомы и SV40 должны вначале подвергнуться сплайсингу, чтобы избавиться от интронов. Стабильные вирусные мРНК могут накапливаться в цитоплазме только после процессинга вирусной РНК. (Молекулы РНК некоторых других вирусов, реплицирующихся в цитоплазме, не нуждаются в сплайсинге.) Недифференцированные стволовые клетки тератоканциномы (гл. 6) непермиссивны для инфицирования и экспрессии генов вирусов полиомы и SV40. Однако, если эти стволовые клетки дифференциру-

ются в клетки соматических типов, они неожиданно становятся доступными для инфицирования этими двумя вирусами. Причиной исходной непермиссивности является, очевидно, неспособность к процессингу РНК. Недифференцированные клетки тератокарциномы не осуществляют сплайсинг предшественников мРНК вируса SV40, тогда как дифференцированные клетки делают это. В стволовых клетках гигантские предшественники мРНК накапливаются и в конце концов разрушаются. Только дифференцированные клетки способны преобразовывать эту ядерную РНК в цитоплазматическую мРНК (Segal et al., 1979). Вирусы, которые не нуждаются в процессинге РНК для экспрессии генов (Синдбис и вирус осповакцины), способны к полноценному росту как в стволовых клетках тератокарциномы, так и в ее дифференцированных производных. Данные о том, что сплайсинг проходит только в дифференцированных клетках мыши (Torre et al., 1977) и производных тератокарциномы, свидетельствуют о зависимости развития клетки от экспрессии собственных ферментов сплайсинга (или их специфических ИРТ-«кофакторов»). Эти агенты, ответственные за процессинг РНК SV40, играют, без сомнения, более подходящую для них роль в клетке и могут отвечать за процессинг некоторых предшественников мРНК, необходимых для клеточной дифференцировки.

Образование альтернативных белков на одном гене: дифференциальный процессинг РНК в иммунной системе

Дифференциальный процессинг РНК оказался чрезвычайно важным для образования ряда специ-

фических белков. Наиболее хорошо изученные случаи относятся к образованию различных иммуноглобулинов (антител) в ходе дифференцировки В-лимфоцитов. Экспрессия генов, кодирующих антитела, в процессе развития лимфоцитов и их ответ на антиген включают в себя многочисленные события, связанные с селекцией и перестройкой генных сегментов. Эти селекция и перестройка осуществляются преимущественно на уровне ДНК (см. гл. 10 и 11). Но некоторые аспекты регуляции экспрессии генов антител проявляются на уровне процессинга РНК.

В процессе своего развития В-лимфоцит, прежде чем он станет клеткой, секретирующей антитела, синтезирует пробные антитела, которые могут секретироваться и встраиваться в плазматическую мембрану. Здесь они функционируют как рецепторы антигена. Поверхностные иммуноглобулины могут принадлежать к классам IgM или IgD в зависимости от стадии развития лимфоцита и от того, контактировал ли он с антигеном того типа, с которым реагируют его антитела. Вначале поверхностные иммуноглобулины относятся к классу IgM; после первой стимуляции антигеном они могут быть одновременно IgM и IgD; впоследствии на клеточной поверхности могут присутствовать только IgD. Но «вариабельная» (антигенсвязывающая) часть иммуноглобулина остается неизменной на протяжении всей жизни конкретного лимфоцита и его дочерних клеток. При этом, как было показано Маки и др. (Maki et al., 1981), переключение с IgM на IgD происходит на уровне процессинга РНК. Синтезируется единый РНК-транскрипт, который содержит экзоны, кодирующие вариабельную (антигенсвязывающую) область и константные области мю (IgM) и дельта

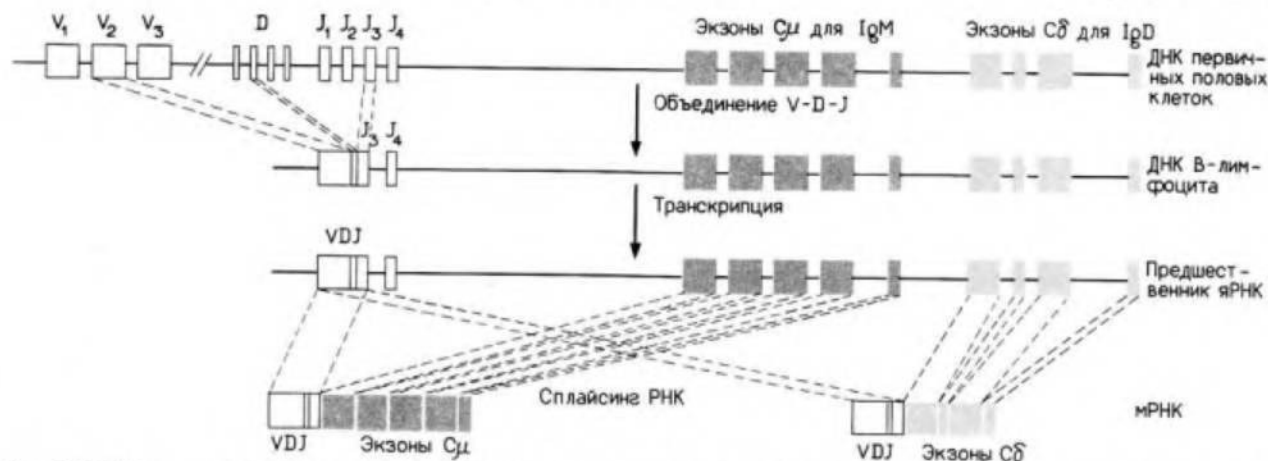


Рис. 13.10. Предлагаемая модель экспрессии IgM и IgD в В-лимфоцитах. Ген тяжелой цепи формируется в ходе развития лимфоцита путем транслокации последовательностей V-, D- и J-областей в положение рядом с последовательностями константной области. Транскрипт этого гена включает в себя обе константные области, μ (IgM) и δ (IgD), вместе с новообразованной вариабельной областью. При альтернативном процессинге могут делетироваться экзоны константной мю-области (C_μ) или экзоны константной дельта-области (C_δ). (По Liu et al., 1980.)

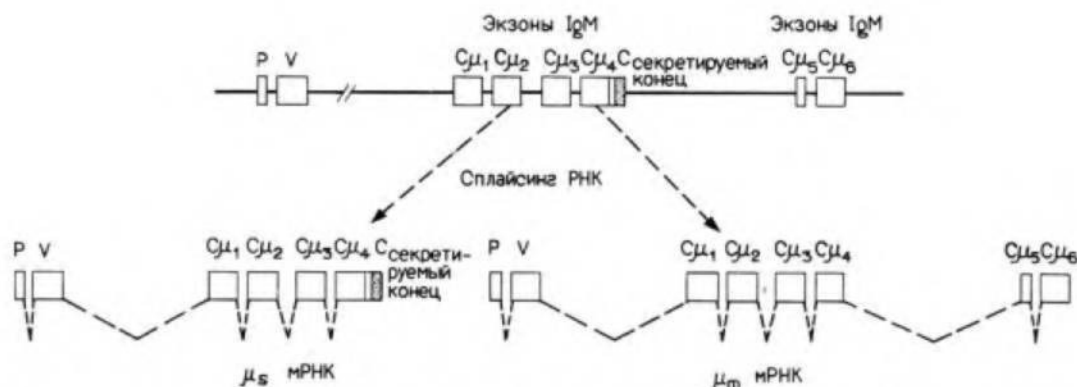


Рис. 13.12. Варианты альтернативного сплайсинга, предложенные для мРНК μ -секреторируемой и μ -мембранной форм IgM. Р включает в себя лидерную последовательность; V кодирует варируемую область; с 5'-стороны располагаются возможные экзоны константной β -области (IgM). РНК, удаляемые при сплайсинге (интроны), изображены штриховыми линиями. (По Early et al., 1980.)

способный встраиваться в мембрану лимфоцита. При сплайсинге РНК решается, какая из молекул будет образована, sIgM или mIgM (рис. 13.12).

Помимо этого в процессе формирования антител имеется третий этап, где дифференциальный процессинг РНК играет важную роль. В каждом В-лимфоците синтезируются молекулы лишь одного типа антител, которые кодируются только одной из двух гомологичных хромосом, имеющих такие гены. Это явление называют **аллельным исключением**. Что происходит с другой хромосомой, имеющей гены антител? Группа исследователей обнаружила ядерные РНК, соответствующие перестроенным или неправильно перестроенным генам антител (Perry et al., 1980). Это наблюдение свидетельствует о том, что происходит транскрипция «неэкспрессирующихся» генов антител, которая не сопровождается процессингом с образованием мРНК.

Дифференциальный процессинг РНК: генерация новых белков в разных клетках в разное время

Дифференциальный процессинг РНК изучали наиболее интенсивно на примере экспрессии имму-

ноглобулиновых генов, однако было установлено, что он контролирует альтернативные формы экспрессии более чем 50 различных белков (Breitbart et al., 1987). В ряде случаев сплайсинг РНК может создавать в разных клетках различные белки. Процессинг определенного предшественника мРНК в некоторых клетках щитовидной железы поставляет мРНК для гормона кальцитонина. Однако в нервных клетках тот же предшественник мРНК проходит процессинг в мРНК для нейропептида CGRP (рис. 13.13) (Amara et al., 1982; Crenshaw et al., 1987). Это явление интересно само по себе, а также потому, что другой транскрипт после альтернативного сплайсинга генерирует в нейронах образование субстанции Р, а в тех клетках щитовидной железы, в которых синтезируется кальцитонин, — субстанции К. Полагают (Crenshaw et al., 1987), что существуют специфические для нейронов регулирующие сплайсинг факторы, которые функционируют на целом наборе предшественников, способных к альтернативному сплайсингу.

Полагают также, что сходным образом пять различных фибронектинов человека генерируются одним вариантом гена фибронектина. Разнообразные (и в ряде случаев органоспецифические) формы



Рис. 13.13. Альтернативный сплайсинг для гена кальцитонина/CGRP. В С-клетках щитовидной железы для формирования мРНК кальцитонина используются экзоны 1, 2, 3 и 4. В клетках мозга для синтеза мРНК нейропептида CGRP используются экзоны 1, 2, 3, 5 и 6. (Из Crenshaw et al., 1987.)

фибронектина транслируются с разных мРНК, возникающих из предшественника фибронектиновой мРНК благодаря соединению вместе различных экзонов (Tamkun et al., 1984; Hynes, 1987). Альтернативный сплайсинг предшественников мРНК генерирует, очевидно, различные формы молекул адгезии нервных клеток N-МКА (Cunningham et al., 1987), а также фетальные и взрослые формы миозина (Nabeshima et al., 1984; Rozek, Davidson, 1986). Таким образом, альтернативный сплайсинг РНК может создавать семейство белков, кодируемых одним геном.

Если один и тот же предшественник мРНК по-разному проходит процессинг в клетках различного типа, то можно ожидать, что образование мРНК зависит от присутствующих в этих клетках факторов процессинга. РНК для тропонина Т – белка, специфичного для мышц и обеспечивающего чувствительность актомиозина к ионам кальция, – образуется в ядре мышечной клетки при сплайсинге, соединяющем вместе определенные экзоны (Breitbart, Nadal-Ginard, 1987). Способность к правильному процессингу предшественника РНК тропонина Т определяется, по-видимому, специфическим для мышц фактором сплайсинга. Немышечные клетки не объединяют нужные экзоны, и этого не делают также одноклеточные миобласты. Лишь многоядерные мышечные трубочки содержат фактор, который

может обеспечить правильный процессинг яРНК-предшественника этого специфического для мышц белка.

Альтернативный процессинг РНК и детерминация пола

Даже если дифференциальный процессинг РНК действительно генерирует некоторые из белков, характеризующих тип дифференцированных клеток, это не обязательно означает, что альтернативный сплайсинг РНК участвует в более ранних событиях, которые определяют судьбу клеток. Однако недавние исследования убедительно свидетельствуют о том, что дифференциальный процессинг РНК играет основную роль в детерминации полового фенотипа дрозофилы (Baker et al., 1987; Boggs et al., 1987).

Как мы увидим в гл. 21, в развитии полового фенотипа у дрозофилы участвуют группы генов, которые преобразуют отношение X-хромосома:аутосома в мужской или женский тип. Одним из ключевых генов в этом процессе является ген *transformer*. Этот ген необходим для дифференцировки самок, и его утрата приводит к появлению самцов независимо от соотношения хромосом. На протяжении всего личиночного периода ген *transformer* активно синтезирует транскрипт, который проходит процессинг в неспецифическую мРНК (имеющуюся и у

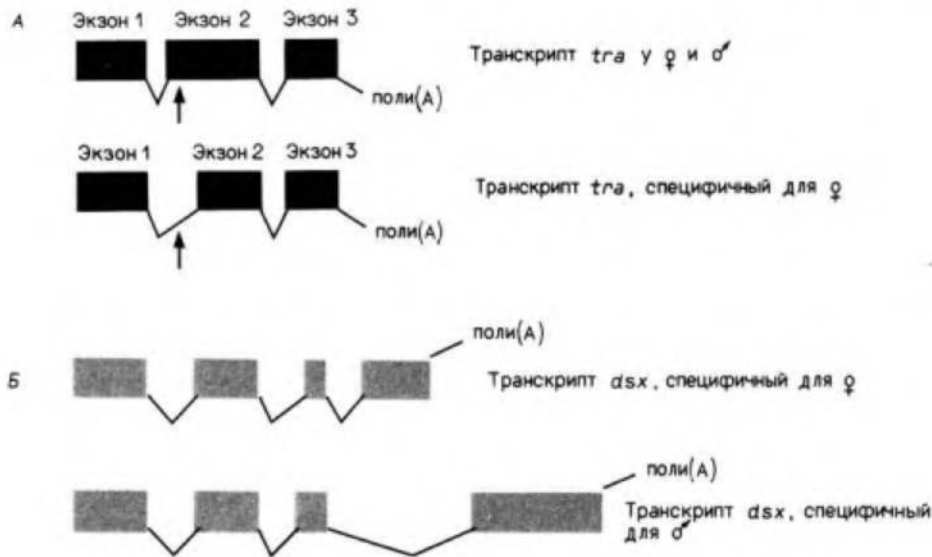


Рис. 13.14. Транскрипты с половой специфичностью в развитии дрозофилы. А. Специфичные для самок и общие транскрипционные продукты, генерируемые геном *transformer* с помощью альтернативного сплайсинга РНК. Стрелкой указан стоп-кодон УГА, который присутствует в экзонах общего транскрипта, но не включается в состав мРНК, специфичной для самок, так как расположен в интроне этого гена. Экзоны представлены в виде прямоугольников, интроны изображены тонкими линиями. Б. Альтернативный сплайсинг РНК гена *doublesex*. На стадии образования куколки ген *doublesex* будет синтезировать продукты, специфичные для самцов, или продукты, специфичные для самок, в зависимости от того, активны ли гены *tra* и *tra-2*. (А – по Boggs et al., 1987; Б – по Baker et al., 1987.)

самок, и у самцов) или специфическую для самок мРНК (рис. 13.14, А). Только самки содержат мРНК, образованную при альтернативном сплайсинге, и она является единственной функциональной мРНК, синтезируемой этим геном. Неспецифическая мРНК, присутствующая и у самцов, и у самок, содержит стоп-кодон (УГА) в начале второго экзона. В отличие от этого в специфической для самок мРНК кодон УГА находится в интроне и не влияет на трансляцию мРНК. Белок, кодируемый такой мРНК, содержит большое количество аргинина, а его длина составляет около 196 аминокислот (Boggs et al., 1987).

В процессе детерминации пола дрозофилы ген *transformer* контролирует, по-видимому, экспрессию основного гена *doublesex* (*dsx*). Ген *doublesex* необходим для формирования фенотипа любого пола, и мутации в этом гене подавляют образование семенников и яичников. На стадии формирования куколки ген *doublesex* синтезирует транскрипт, который может подвергнуться процессингу двумя альтернативными способами. Он может генерировать

мРНК, специфичную для самок, или мРНК, специфичную для самцов (рис. 13.14, Б) (Baker et al., 1987). У самок и самцов первые три экзона этого гена одинаковы, а четвертые экзоны различаются. В специфичной для самцов РНК делегирован большой фрагмент РНК-предшественника, который включает в себя специфичный для самок экзон.

Авторы этой работы полагают, что гены детерминации пола, функционирующие ранее гена *doublesex* (*transformer* и *transformer-2*), нужны для образования фактора сплайсинга, который обеспечивает процессинг РНК-предшественника в мРНК, специфичную для самок. Если оба гена *transformer* отсутствуют (как при мутациях) или не активны (как у мух, характеризующихся фенотипом ХУ; см. гл. 21), то транскрипт гена *doublesex* проходит процессинг способом, специфичным для самцов, и образуются самцы. Если эта гипотеза правильна, то дифференциальный процессинг РНК играет исключительно важную роль на протяжении всего индивидуального развития.

Дополнительные сведения и гипотезы Биохимия процессинга РНК

Как осуществляется сплайсинг предшественников мРНК? Каким образом из одного предшественника могут возникать различные мРНК? Изучение биохимии процессинга РНК началось сравнительно недавно, поэтому в настоящее время мы не можем полностью прояснить эту довольно малоизученную область. Двумя наиболее важными открытиями за последние несколько лет явились обнаружение разветвленных промежуточных продуктов РНК и идентификация каталитических рибонуклеопротеидных частиц внутри ядра.

Сайты сплайсинга

Сравнение последовательностей ДНК большого числа различных генов выявило определенное сходство в местах соединения интронов и экзонов. Последовательность оснований интрона обычно начинается с ГТ, а последовательность оснований экзона обычно оканчивается на АГ (табл. 13.3). Фактически «консенсусная последовательность» для 5'-концов интронов — АГ/ГТ (т. е. большинство экзонов оканчивается на АГ, а интрон начинается с ГТ), а 3'-концевая последовательность большинства интронов — ТТНЦАГ (где N может быть любым нуклеотидом). Эти сайты оказываются очень важными для процессинга интрона. Болезнь β-талассемия характеризу-

ется генетической недостаточностью продукции β-глобинов. При этом мутации возникают не в экзонах, кодирующих глобиновый белок, а в *интронах*. В случае одной из таких мутаций, приводящих к талассемии, последовательность ТТГГТЦТ в первом интроне изменена на ТТАГТЦТ. Обычный 3'-концевой сайт сплайсинга для этого интрона — ТТАГ/ГЦТ. Поэтому данная мутация создает искусственный сайт сплайсинга, благодаря чему появляется возможность для ошибочного сплайсинга (Spritz et al., 1981). На самом деле β-глобиновый предшественник при талассемии претерпевает сплайсинг в неправильных местах с вероятностью выше 90% (Buslinger et al., 1981).

Сайты разветвления

Помимо сайтов сплайсинга существует еще одна последовательность, необходимая для правильного вырезания интронов. Это **сайт разветвления**. Он расположен внутри интрона обычно на расстоянии около 20–50 нуклеотидов выше 3'-концевого сайта сплайсинга и имеет консенсусную последовательность УАУААЦ. В большинстве положений У может быть заменен на Ц, а А — на Г. Однако предпоследний (подчеркнутый) остаток А является незаменимым. Этот остаток А имеет ключевое значение,

Таблица 13.3. Последовательности нуклеотидов в местах соединения кодирующих областей и промежуточных последовательностей¹⁾

Организм	Ген и интрон	Кодирующая последовательность	Промежуточная последовательность	Кодирующая последовательность
Курица	Овальбумин 1	...ТЦААААГ	ГТАГГЦ...ТГЦТЦТАГ	АЦААЦТЦ...
	Овальбумин 2	...АААТААГ	ГТГАГЦ...ААТТАЦАГ	ГТТГТТЦ...
	Овальбумин 3	...АГЦТЦАГ	ГТАЦАГ...ГТАТТЦАГ	ТГТГГЦА...
	Овальбумин 4	...ЦТТГЦЦА	ГТААГТ...ЦТТТАЦАГ	ГААТАЦТ...
	Овальбумин 5	...АЦАААТГ	ГТААГТ...ТЦТТАААГ	ГААТТАТ...
	Овальбумин 6	...ГАЦТГТАГ	ГТАТАТ...ТГЦТЦТАГ	ЦААГААА...
	Овальбумин 7	...ТГАГЦАГ	ГТАТАТ...ЦТТГЦЦАГ	ЦТТГАГА...
Мышь	β^{maj} -глобин 1	...ТГГГЦАГ	ГТГАГЦ...ЦТТГТТАГ	ГЦТГЦТГ...
Кролик	β -глобин 1	...ТГГГЦАГ	ГТГАГЦ...ЦТТГТТАГ	ГЦТГЦТГ...
Мышь	β^{maj} -глобин 2	...ЦТТЦАГГ	ГТГАГТ...ТЦЦЦАЦАГ	ЦТЦЦТГ...
Кролик	β -глобин 2	...ЦТТЦАГГ	ГТГАГТ...ТЦЦТАЦАГ	ЦТЦЦТГ...
Мышь	α -глобин 2	...ЦТТЦААГ	ГТАТГЦ...	
Крыса	V_{H} -иммуноглобулин 1	...ТГЦТЦАГ	ГТЦАГЦ...ГТТГЦЦАГ	ГАГЦЦА...
	C_{H} -иммуноглобулин 2	...ГТТАЦАГ	ГТААГТ...АТЦТТТАГ	ТЦЦАГА...
	Инсулин I и II-1	...ЦААГЦАГ	ГТАЦТЦ...ТЦТТЦЦАГ	ГТЦАТТГ...
	Инсулин II-2	...ЦЦАЦААГ	ГТААГЦ...ЦЦТГГЦАГ	ТГЦАЦА...
<i>Bombyx mori</i>	Фиброин шелка	...ТЦТГЦАГ	ГТГАГТ...ТГТТТЦАГ	ТАТГТЦГ...
Консенсусная последовательность		АГ / ГТ	ТТНЦАГ	

Источник: Lewin, 1980.

¹⁾ Представлены последовательности ДНК, гомологичные последовательностям РНК, с совмещенными сайтами соединения экзонов и интронов. Точное место сплайсинга указать нельзя, так как последние основания первой кодирующей области обычно повторены на правом конце интрона. В конце таблицы приведены консенсусные последовательности, общие для большинства границ экзон/интрон (АГ/ГТ) и соединений интрон/эксон (ТТНЦАГ).

поскольку он образует фосфодизфирное «разветвление» с фосфатом 5'-концевого сайта сплайсинга (рис. 13.15). Он делает это, используя свою свободную 2'-гидроксильную группу для соединения с фосфатом из 5'-сайта сплайсинга. Таким образом, фосфат из ГМФ, вместо того чтобы удерживать первый экзон, высвобождает его и зацепляется за 2'-гидроксильную группу АМФ в сайте разветвления. В результате этого маневра высвобождается первый экзон и образуется «лариатная» (типа лассо) структура в качестве промежуточной.

Свободный 3'-ОН-конец первого экзона присоединяется затем к фосфату в 3'-сайте сплайсинга ниже петли лариата, благодаря чему первый экзон заменяет собой интрон. В результате происходит соединение двух экзонов с помощью группы АГ из первого экзона и Г из второго экзона (Sharp, 1987).

Промежуточный продукт, напоминающий по форме лассо, с 2'—5' фосфодизфирной связью был обнаружен в опытах с клонированным фрагментом β -глобинового гена человека, состоящим из первых двух экзонов и интрона между ними (Ruskin et al., 1984). РНК, транскрибированную с этого клона, добавляли в экстракт ядер из клеток человека, способный осуществлять сплайсинг этого «предшественника» по соответствующим сайтам (Krainer et al., 1984). Для завершения этой реакции *in vitro*

требуется около часа, после чего можно изолировать промежуточные продукты с помощью гелеэлектрофореза (поскольку лариатная структура затрудняет миграцию при электрофорезе). Химический анализ этих промежуточных продуктов подтвердил, что нуклеотид А в сайте разветвления имеет две фосфодизфирные связи, одну с участием 2'-ОН-группы и одну с участием 3'-ОН-группы. Вскоре после этого были идентифицированы аналогичные промежуточные продукты β -глобиновых транскриптов при процессинге *in vivo* в зародышах кролика (Zeitlin, Efstratiadis, 1984).

Роль малых ядерных рибонуклеопротеидных частиц

В ядрах многоклеточных организмов реакции сплайсинга не происходят самопроизвольно¹. На самом деле они катализируются частицами, состоящими из малых ядерных РНК (мяРНК) и белков. Эти малые рибонуклеопротеидные частицы обо-

¹ Вызывает удивление, что такой самопроизвольный сплайсинг на самом деле происходит при удалении интронов из транскриптов митохондриальных генов дрожжей и из рибосомной РНК простейшего *Tetrahymena* (см. Sharp, 1987).

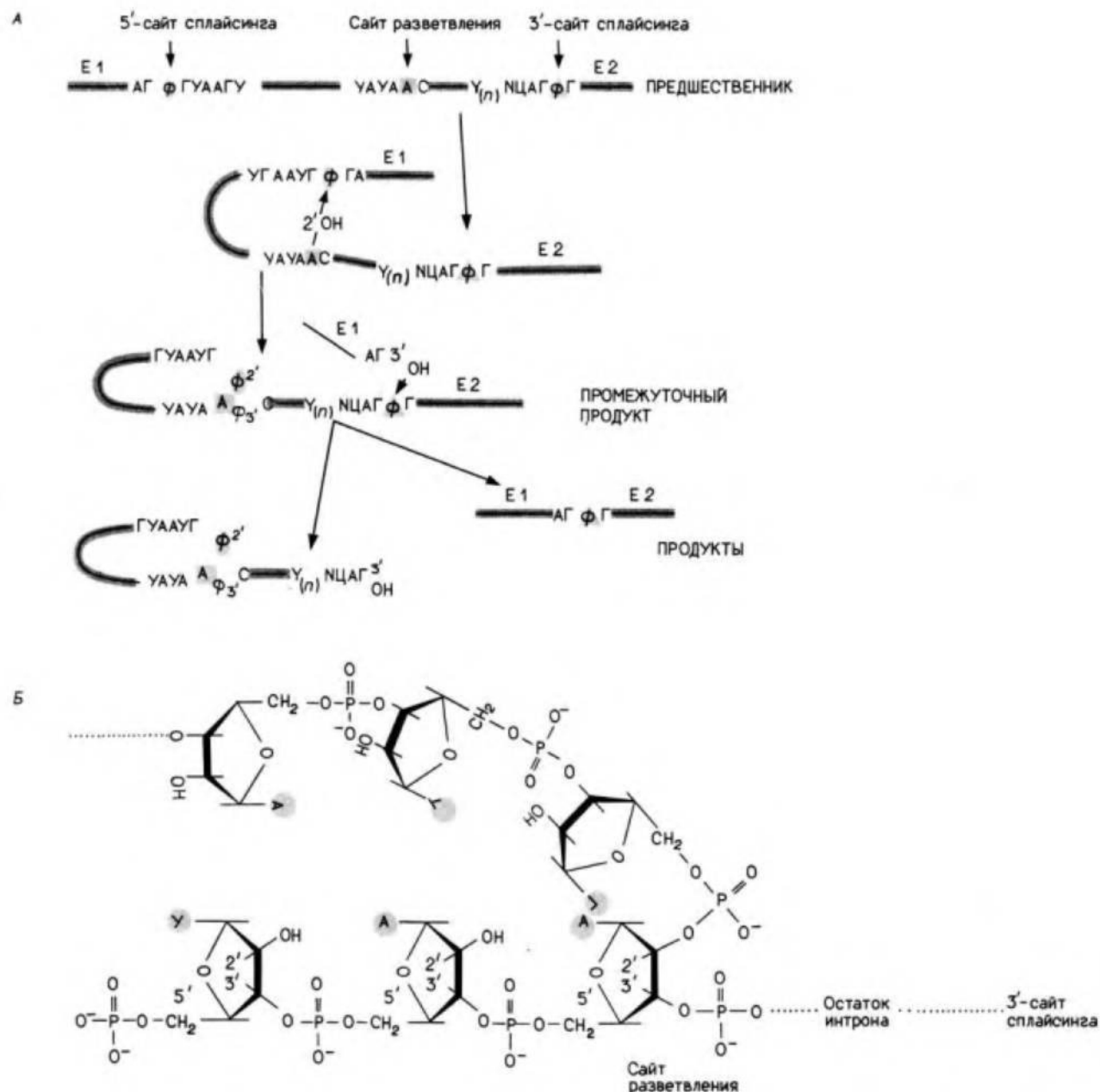


Рис. 13.15. Гипотетический механизм сплайсинга предшественника мРНК. **А.** Схематическое изображение участка предшественника РНК с интроном от 5'-сайта до 3'-сайта сплайсинга. Показаны консенсусные последовательности в местах сплайсинга, а также место разветвления и окружающие его нуклеотиды. Сплайсинг осуществляется в два этапа. Первый этап заключается в формировании структуры типа лассо, когда фосфат с 5'-стороны от места сплайсинга образует фосфодизфирную связь с 2'-ОН-группой АМФ в сайте разветвления. Образование петли приводит к отсоединению первого экзона (Е1). На втором этапе концевая ОН-группа первого экзона замещает интрон на 5'-конце второго экзона (Е2). Фосфатные группы, вовлеченные в реакции, обозначены эллипсами или треугольниками. **Б.** Схема замыкания сайта разветвления. (А — из Sharp, 1987, с изменениями.)

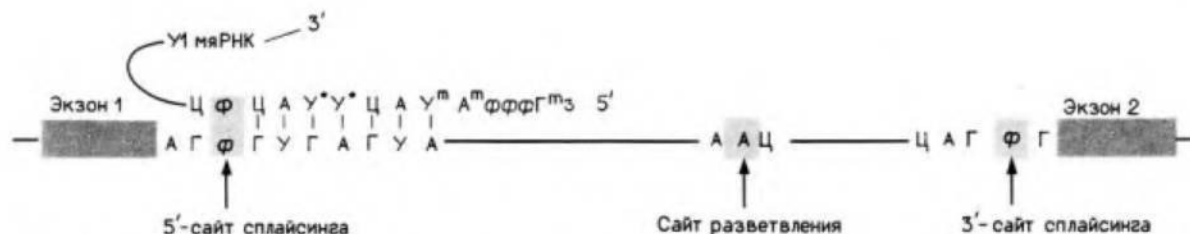


Рис. 13.16. Присоединение U1 мРНК к 5'-участку сплайсинга интрона. Консенсусная последовательность на 5'-границе экзон-интрон комплементарна к 5'-концу U1 мРНК. Метильная группа обозначена буквой «m». Посттранскрипционная модификация уридина обозначена звездочкой. (По Padgett et al., 1985.) (На рис. 13.16–13.18 U1 и т. д. мРНК обозначена как U1 и т. д. мРНК.)

значают как мРНК. Существует пять основных мРНК – U1, U2, U4, U5 и U6, – каждая из которых присутствует в количестве от $2 \cdot 10^5$ до $2 \cdot 10^6$ копий на ядро и содержит от 56 до 217 нуклеотидов. Помимо этого в меньших количествах содержатся многочисленные другие мРНК. Каждая мРНК-частица содержит одну молекулу мРНК в комплексе приблизительно с десятью белками (Maniatis, Reed, 1987).

Первые предположения об участии мРНК в сплайсинге вытекали из наблюдения, что 5'-концевой участок U1 мРНК комплементарен 5'-сайту сплайсинга интронов (рис. 13.16; Lerner et al., 1980; Rogers, Wall, 1980). Последующие опыты (Mount et al., 1983; Tatei, 1984) показали, что очищенные U1 мРНК специфически связываются с последовательностями 5'-сайтов сплайсинга в РНК-предшественниках (рис. 13.17), а U2 мРНК специфически присоединяются к сайтам разветвления. Если U2 мРНК смешать с предшественниками мРНК и затем добавить РНКазу, то единственной РНК, защищенной от гидролиза, окажется РНК в сайтах разветвления и в участках, окружающих эти сайты (потому что эти участки закрыты присоединенными U2 мРНК) (Black et al., 1985). Другие мРНК, вероятно U5, присоединяются к 3'-сайтам сплайсинга, так как эти мРНК способны защищать 3'-сайт сплайсинга от расщепления РНКазой (Chabot et al., 1985). Полагают, что это взаимодействие опосредовано узнаванием последовательности 3'-сайта белковым, а не рибонуклеиновым компонентом мРНК (Tazi et al., 1986).

Сплайсинг осуществляется только после того, как различные мРНК войдут в контакт друг с другом и образуют на предшественнике мРНК **сплайсому**. Гипотетическая схема сборки сплайсома представлена на рисунке 13.16. Когда U1 (и, возможно, U5) мРНК связываются с предшественником мРНК, они позволяют присоединиться U2. Вероятно, после этого связываются U4, U5 и U6, хотя точный порядок пока не установлен (Grabowski et al., 1985; Black, Steitz, 1986). Сплайсома, подобно рибосоме, участвует в сближении различных РНК друг с другом и образует новые ковалентные связи.

Конкретные субстраты, промежуточные продукты и катализаторы этих реакций пока неизвестны.

Следует помнить также, что сплайсосома не встречается с «голыми» предшественниками мРНК. Сами молекулы пре-мРНК связаны с высококонсервативными основными белками (как показано на рис. 13.18), и эти белки сворачивают РНК в специфические структуры (Skoglund et al., 1983, 1986). Например, комплекс глобиновой яРНК с белком свернут таким образом, что определенные участки предшественника мРНК экспонированы в большей степени, чем другие участки (Patton, Chae, 1985). Поэтому сворачивание РНК этими белками позво-

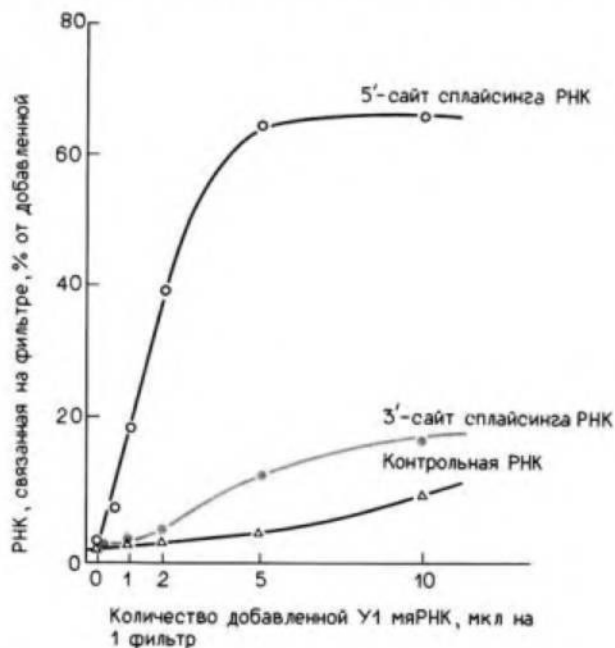


Рис. 13.17. Специфическое связывание U1 мРНК с очищенными фрагментами РНК. Незначительное связывание наблюдается в случае, когда U1 мРНК смешивается со всей РНК или с 3'-участками сплайсинга. Значительное связывание наблюдается в случае, когда эти мРНК смешиваются с фрагментами, содержащими 5'-участки сплайсинга. (Из Tatei et al., 1984.)

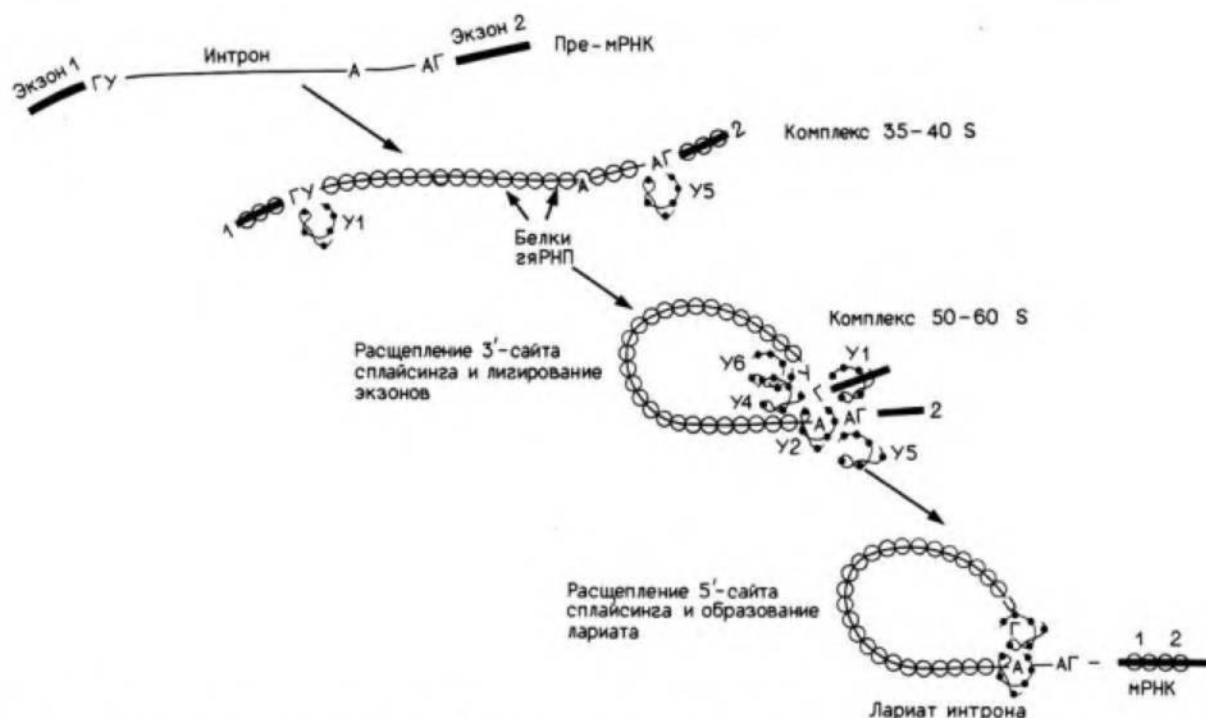


Рис. 13.18. Гипотетическая модель сборки сплайсосомы и сплайсинга пре-мРНК. На первом этапе U1 и U5 мяРНК связываются соответственно с 5'- и 3'-сайтами сплайсинга. К предшественнику мРНК (пре-мРНК) присоединяются также РНК-связывающие белки. Отщепление 5'-экзона происходит, когда 5'-сайт сплайсинга присоединяется к месту разветвления. U2, U4 и U6 мяРНК связываются, по-видимому, рядом с этим местом и образуют сплайсосому, расщепляя 3'-сайт сплайсинга и присоединяя 5'-экзон к 3'-экзону. (По Maniatis, Reed, 1987.)

ляет с большей эффективностью узнавать определенные сайты сплайсинга, чем другие возможные сайты (свойство, которое становится важным, когда интроны простираются на 10 000 или более нуклеотидов). Некоторые из этих белков, связывающих

яРНК, могут быть важны также и для сплайсинга. Группа таких белков (С-белки) обнаружена в сплайсосоме, и антитела против этих белков ингибируют разрезание РНК и образование разветвлений (Choi et al., 1986).

Образование 3'-конца РНК

Рибонуклеопротеидные комплексы, как полагают, важны также для определения положения, по которому предшественник мРНК разрезается на 3'-конце и к которому присоединяется полиаденилатный хвост. Первичный РНК-транскрипт содержит 3'-«хвостовую» последовательность, которая простирается далеко за точку, где оканчивается мРНК. Внутри этой области имеется последовательность ААУААА, необходимая для разрезания РНК на расстоянии 10-30 оснований ниже (с 3'-стороны) от этого сайта (Proudfoot, Brownlee, 1976). Мутации в этой последовательности нарушают формирование 3'-конца мРНК (Wickens, Stephenson, 1984; Orkin et al., 1985). Если сайт ААУААА в β-глобиновой РНК человека изменен на ААЦААА, то 3'-конец новой РНК находится на расстоянии 900 нуклеотидов ниже обычного сайта полиаденилирования в

пределах 15 нуклеотидов от следующего сайта ААТААА в 3'-фланкирующей области гена. Отрезание 3'-хвоста и полиаденилирование предшествуют сплайсингу, поэтому реакции сплайсинга проходят на полиаденилированном предшественнике мРНК. Кроме того, как мы видели ранее, в некоторых случаях имеются альтернативные сайты присоединения поли(А) (что наблюдается, например, при синтезе иммуноглобулинов). Что контролирует выбор одного из альтернативных поли(А)-сайтов и как присоединяются поли(А)-хвосты, в настоящее время неизвестно.

Возможно, что в узнавании этой последовательности также участвуют мяРНК. Было показано, что антитела к мяРНК осаждают фрагмент РНК, содержащий последовательность ААУААА (Hashimoto, Steitz, 1986), а U7 РНК необходима для разрезания на 3'-хвосте предшественника мРНК гистона H3 у морского ежа (Strub, Birnstiel, 1987). Механизмы

разрезания РНК-предшественников и присоединения поли(А)-хвостов еще предстоит выяснить.

Имеется ряд примеров, когда транскрипция прекращается преждевременно и получается транскрипт без поли(А)-хвоста. Его отсутствие приводит к быстрому разрушению укороченной РНК. По-видимому, подобным образом регулируются по крайней мере два белка, контролирующие пролиферацию клеток. В покоящихся клетках иницируется транскрипция этих генов, но образуются неполные транскрипты. И лишь в растущих клетках синтезируются полные РНК (Bentley, Groudine, 1987; Bender et al., 1987). По крайней мере в одном из этих примеров мутации вблизи 3'-конца первого экзона (где может происходить преждевременная терминация) вызывают образование полных транскриптов в клетках, в которых в норме транскрипция оканчивается преждевременно (Ceserman et al., 1987). В этих случаях синтезируется белок, стимулирующий рост клеток, и клетки становятся злокачественными.

Транспорт из ядра

До сих пор наиболее загадочным в процессинге РНК остается вопрос о том, как он связан с транс-

портом мРНК из ядра. Полагают, что мРНК выходит из ядра через ядерные поры. Строение такой поры и РНК, проходящая через нее, показаны на рис. 13.19. Если РНК транскрибируется на ядерном матриксе (как предполагалось в гл. 12), то вполне вероятно, что матриксе содержит также мРНК, необходимые для ее процессинга. На ядерном матриксе были обнаружены предшественники β -глобиновой мРНК кролика, не прошедшие сплайсинг или прошедшие его частично (Zeitlin et al., 1987), а также прошедшие частично сплайсинг предшественники овальбуминовой мРНК из клеток яйцевода курицы (Ciejek et al., 1982).

Ядерная оболочка со стороны цитоплазмы часто бывает усеяна рибосомами. Не могут ли рибосомы захватывать мРНК, когда она выходит из пор, и вытягивать мРНК из ядер по мере ее трансляции? Мы не можем дать утвердительный ответ на этот вопрос, однако существует по крайней мере один факт, свидетельствующий в пользу такой возможности. При определенной форме β -талассемии человека мутация локализована в 39-м кодоне, который становится кодоном-терминатором. Естественно поэтому, что мутантный ген не синтезирует β -глобин. Но этим не объяснить, почему в цитоплазме

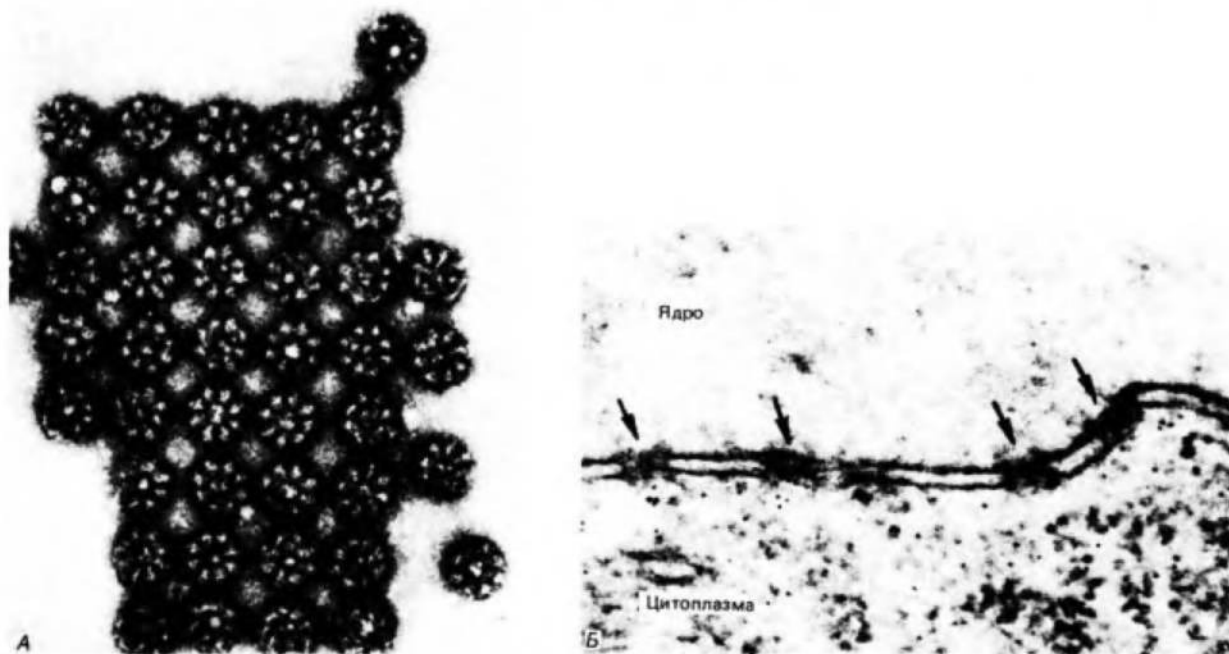


Рис. 13.19. Ядерные поры и транспорт РНК. А. Ядерные поры из ооцитов *Xenopus laevis*. Кольцевая структура поры формируется из восьми субъединиц. Внутри этого кольца имеется центральная глобула, которая может представлять собой РНК, покидающую ядро, или регуляторный элемент самой поры. Б. Если в ооцит *Xenopus* инъецируют РНК, покрытую частицами золота, то с помощью электронного микроскопа можно наблюдать транспорт этой РНК из ядра. (Комплексы других полимеров с золотом не экспортируются.) На рисунке показаны покрытые золотом молекулы тРНК в процессе транспорта через центральный канал ядерной поры. (А — из Unwin, Mulligan, 1982; Б — из Dworetzky, Feldherr, в печати; фотографии с любезного разрешения авторов.)

наблюдается дефицит β -глобиновой мРНК. Было обнаружено, что мутантная мРНК (синтезированная на клонированном гене *in vitro*) не уступает в стабильности β -глобиновой мРНК дикого типа (Humphries et al., 1984), и было высказано предположение, что для выхода глобиновой мРНК из ядра, возможно, требуется ее трансляция на цитоплазматической стороне ядерной оболочки (Orkin, Kazan, 1984). Когда эта трансляция прекращается (из-за образования кодона-терминатора), прекращается также транспорт мРНК из ядра.

Многое предстоит еще выяснить, прежде чем мы сможем указать этапы, на которых происходит регуляция сплайсинга РНК в развитии. Это могло бы происходить при связывании мРНК, образовании сплайсосомы, формировании 3'-конца или при транспорте РНК в цитоплазму. Была отмечена гетерогенность U1 класса мРНК и высказано предположение, что у зародышей *Xenopus* существует не менее 7 различных типов U1 мРНК и они характерны для различных периодов развития (Forbes et al., 1984). Авторы этой работы полагают, что различия в последовательностях мРНК могли бы обуславливать присоединение различных белков, а это в свою очередь позволило бы осуществлять сплайсинг различных предшественников мРНК. Однако в настоящее время мы не можем указать на конкретный внутриядерный механизм селекции определенных специфических РНК-предшественников для процессинга в тканеспецифические цитоплазматические мРНК.

Резюме

Процессинг РНК должен рассматриваться как основной способ регуляции дифференциальной экспрессии генов. Экспериментальные данные свидетельствуют, что он определяет популяцию специфических для клеток мРНК при развитии морского ежа и, по-видимому, также мыши и крысы. Секвенирование ДНК и РНК показало, что дифференциальный процессинг РНК может приводить к возникновению различных белков в клетках разных типов (кальцитонин или CGRP; IgM или IgD) или в разные периоды в одной клеточной линии (мембрансвязанные и секретируемые IgM; миозины). Полагают также, что регуляция дифференциального процессинга ответственна за детерминацию полового фенотипа дрозофилы. Раскрытие механизма, лежащего в основе дифференциального процессинга РНК, возможно, позволит нам проникнуть в суть клеточной дифференцировки и эмбриональной детерминации.

Литература

- Alt F. W., Bothwell A. L. M., Knapp M. N., Siden E., Mather E., Koshland M., Baltimore D. (1980). Synthesis of secreted and membrane-bound immunoglobulin μ heavy chains is directed by mRNAs that differ at their 3' ends. *Cell* **20**, 293–301.
- Amara S. G., Jonas V., Rosenfeld M. G., Ong E. S., Evans R. M. (1982). Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature* **298**, 240–244.
- Axel R., Feigleson P., Schutz G. (1976). Analysis of the complexity and diversity of mRNA from chicken liver and oviduct. *Cell* **7**, 247–254.
- Baker B., Nagoshi R. N., Burtin K. C. (1987). Molecular genetic aspects of sex determination in *Drosophila*. *BioEssays* **6**, 66–70.
- Bastos R. N., Aviv H. (1977). Globin RNA precursors molecules: Biosynthesis and processing erythroid cells. *Cell* **11**, 641–650.
- Bender T. P., Thompson C. B., Kuehl W. M. (1987). Differential expression of *c-myc* mRNA in murine B lymphomas by a block to transcription elongation. *Science* **237**, 1473–1476.
- Bentley D. L., Groudine M. (1987). A block to elongation is largely responsible for decreased transcription of *c-myc* in differentiated HL60 cells. *Nature* **321**, 702–706.
- Black D. L., Charbot B., Steitz J. (1985). U2 as well as U1 small nuclear ribonucleoproteins are involved in pre-mRNA splicing. *Cell* **42**, 737–750.
- Black D. L., Steitz J. A. (1986). Pre-mRNA splicing *in vitro* requires intact U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein. *Cell* **46**, 697–704.
- Boggs R. T., Gregor P., Idriss S., Belote J. M., McKeown M. (1987). Regulation of sexual differentiation in *D. melanogaster* via alternative splicing of RNA from the *transformer* gene. *Cell* **50**, 739–747.
- Breitbart R. E., Andreadis A., Nadal-Ginard B. (1987). Alternative splicing: A ubiquitous mechanism for the generation of multiple protein isoforms from single genes. *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 467–495.
- Breitbart R. E., Nadal-Ginard B. (1987). Developmentally induced, muscle-specific factors control the differential splicing of alternative and constitutive troponin T exons. *Cell* **49**, 793–803.
- Britten R. J., Kohne D. E. (1968). Repeated sequences in DNA. *Science* **161**, 529–540.
- Busslinger M., Moschonas N., Flavell R. A. (1981). β^+ thalassemia: Aberrant splicing results from a single point mutation in an intron. *Cell* **27**, 289–298.
- Ceserman E., Dalla-Favera R., Bentley D., Groudine M. (1987). Mutations in the first exon are associated with altered transcription in *c-myc* in Burkitt lymphoma. *Science* **238**, 1272–1275.
- Chabot B., Black D. L., LeMaster D. M., Steitz J. A. (1985). The 3' splice site of pre-messenger RNA is recognized by a small ribonucleoprotein. *Science* **230**, 1344–1349.
- Chikaraishi D. M., Deeb S. S., Sueoka N. (1978). Sequence complexity of nuclear RNAs in adult rat tissues. *Cell* **13**, 111–120.
- Choi Y.-D., Dreyfuss G. (1984). Isolation of the heterogeneous nuclear RNA-ribonucleoprotein complex (hnRNP): A unique supramolecular assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 7471–7475.
- Ciejek E. M., Nordstrom J. L., Tsai M. J., O'Malley B. W. (1982). Ribonucleic acid precursors are associated with the chick oviduct nuclear matrix. *Biochem.* **21**, 4945–4953.
- Crenshaw E. B., III, Russo A. F., Swanson L. W., Rosenfeld M. G. (1987). Neuron-specific alternative RNA processing in transgenic mice expressing a metallothionein-calcitonin fusion gene. *Cell* **49**, 389–398.
- Cunningham B. A., Hemperly J. J., Murray B. A., Prediger A. E., Brackenbury R., Edelman G. M. (1987). Neural cell adhesion

- molecule: Structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science* **236**, 799-806.
- Davidson E. H., Britten R. J. (1979). Regulation of gene expression: Possible role of repetitive sequences. *Science* **204**, 1052-1059.
- Dworetzky S., Feldherr C. In press. RNA efflux through the nuclear pore.
- Early P., Rogers J., Davis M., Dalame K., Bond M., Wall R., Hood L. (1980). Two mRNAs can be produced from a single immunoglobulin gene by alternative RNA processing pathways. *Cell* **20**, 313-319.
- Forbes D. J., Kirschner M. W., Caput D., Dahlberg J. E., Lund E. (1984). Differential expression of multiple U1 small nuclear RNAs in oocytes and embryos of *Xenopus laevis*. *Cell* **38**, 681-689.
- Galau G. A., Klein W. H., Davis M. M., Wold B. J., Britten R. J., Davidson E. H. (1976). Structural gene sets active in embryos and adult tissues of the sea urchin. *Cell* **7**, 487-505.
- Gottesfeld J. M., Partington G. A. (1977). Distribution of messenger RNA coding sequences in fractionated chromatin. *Cell* **12**, 953-962.
- Grabowski P. J., Seiler S. R., Sharp P. A. (1985). A multicomponent complex is involved in the splicing of messenger RNA precursors. *Cell* **42**, 345-353.
- Hames B. D., Perry R. P. (1977). Homology relationship between the messenger RNA and heterogeneous nuclear RNA of mouse L cells. A DNA excess hybridization study. *J. Mol. Biol.* **109**, 437-453.
- Hashimoto C., Steitz M. A. (1986). A small ribonucleoprotein associates with the AAUAAA polyadenylation signal in vitro. *Cell* **45**, 581-591.
- Hood L. E., Wilson J. H., Wood W. B. (1975). The Molecular Biology of Eukaryotic Cells. Benjamin, New York.
- Humphries R. K., Ley T. J., Anagnou N. P., Baur A. W., Nienhuis A. W. (1984). β -39 thalassemia gene: A premature termination codon causes β -mRNA deficiency without affecting cytoplasmic β -mRNA stability. *Blood* **64**, 23-32.
- Humphries S., Windass J., Williamson J. (1976). Mouse globin gene expression in erythroid and nonerythroid tissue. *Cell* **7**, 267-277.
- Hynes R. O. (1987). Fibronectins: A family of complex and versatile adhesive glycoproteins derived from a single gene. *Harvey Lect.* **81**, 133-152.
- Kleene K. C., Humphreys T. (1977). Similarity of hnRNA sequences in blastula and pluteus stage sea urchin embryos. *Cell* **12**, 143-155.
- Kleene K. C., Humphreys T. (1985). Transcription of similar sets of rare maternal RNAs and rare nuclear RNAs in sea urchin blastulae and adult coelomocytes. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **85**, 131-149.
- Krainer A. R., Maniatis T., Ruskin B., Green M. R. (1984). Normal and mutant human β -globin pre-messenger RNAs are faithfully and efficiently spliced in vitro. *Cell* **36**, 993-1005.
- Lerner M. R., Boyle J. A., Mount S. M., Wolin S. L., Steitz J. A. (1980). Are snRNPs involved in splicing? *Nature* **283**, 220-224.
- Lewin B. (1980). Gene Expression 2, 2nd Ed. Wiley-Interscience, New York, pp. 694-760.
- Liu C.-P., Tucker P. W., Mushinski F., Blattner F. R. (1980). Mapping of heavy chain genes for mouse immunoglobulins M and G. *Science* **209**, 1348-1353.
- Maki R., Roeder W., Traunecker A., Sidman C., Wahl M., Raschke W., Tonegawa S. (1981). The role of DNA rearrangement and alternate mRNA processing in the expression of immunoglobulin delta genes. *Cell* **24**, 353-365.
- Maniatis T., Reed R. (1987). The role of small nuclear ribonucleoprotein particles in pre-mRNA splicing. *Nature* **325**, 673-678.
- McCarthy B. J., Hoyer B. H. (1964). Identity of DNA and diversity of RNA in normal mouse tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **52**, 915-922.
- Mount S. M., Pettersson I., Hinterberger M., Karmas A., Steitz J. (1983). The U1 small nuclear RNA-protein complex selectively binds a 5' splice site in vitro. *Cell* **33**, 509-518.
- Nabeshima Y., Fujii-Kuriyama Y., Muramatsu M., Ogata K. (1984). Alternative transcription and two modes of splicing result in two myosin light chains from one gene. *Nature* **308**, 333-338.
- Orkin S. H., Cheng T.-C., Antonarakis S. E., Kazazian H. H., Jr. (1985). Thalassemia due to a mutation in the cleavage-polyadenylation signal of the human β -globin gene. *EMBO J.* **4**, 453-456.
- Orkin S. H., Kazazian H. H. (1984). The mutation and polymorphism of the human β -globin gene and its surrounding DNA. *Annu. Rev. Genet.* **18**, 131-171.
- Padgett R. A., Grabowski P. J., Konarska M. M., Sharp P. A. (1985). Splicing messenger RNA precursors: Branch sites and lariat RNAs. *Trends Biochem. Sci.* **10**, 154-157.
- Patton J. R., Chae C.-B. (1985). Specific regions of the intervening sequences of β -globin RNA are resistant to nuclease in 50 S heterogeneous nuclear RNA-protein complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 8414-8418.
- Perlman S. M., Ford P. J., Rosbash M. M. (1977). Presence of tadpole and adult globin RNA sequences in oocytes of *Xenopus laevis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 3835-3839.
- Perry R. P., Kelley D. E., Coleclough C., Seidman J. G., Leder P., Tonegawa S., Matthysens G., Weigart M. (1980). Transcription of mouse α chain genes: Implications for allelic exclusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 1937-1941.
- Proudfoot N. J., Brownlee G. G. (1976). 3' Noncoding region sequences in eukaryotic messenger RNA. *Nature* **263**, 211-214.
- Rogers J., Early P., Carter C., Calame K., Bond M., Hood L., Wall R. (1980). Two mRNAs with different 3' ends encode membrane-bound and secreted forms of immunoglobulin μ chain. *Cell* **20**, 303-312.
- Rogers J., Wall R. (1980). A mechanism for RNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 1877-1879.
- Rozek C. E., Davidson N. (1986). Differential processing of RNA transcribed from single-copy *Drosophila* myosin heavy chain gene produces four mRNAs that encode two polypeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 2128-2132.
- Ruskin B., Krainer A. R., Maniatis T., Green M. R. (1984). Excision of an intact intron as a novel lariat structure during pre-mRNA splicing in vitro. *Cell* **38**, 317-331.
- Scheller R. H., Costantini F. D., Kozlowski M. R., Britten R. J., Davidson E. H. (1978). Specific representation of cloned repetitive DNA sequences in sea urchin RNAs. *Cell* **15**, 189-203.
- Segal S., Levine A. J., Khoury G. (1979). Evidence for non-spliced SV40 RNA in undifferentiated murine teratocarcinoma stem cells. *Nature* **280**, 335-338.
- Sharp P. A. (1987). Splicing of messenger RNA precursors. *Science* **235**, 766-771.
- Skoglund U., Andersson K., Bjorkroth B., Lamb M. M., Daneholt B. (1983). Visualization of the formation and transport of a specific hnRNP particle. *Cell* **34**, 847-855.
- Skoglund U., Andersson K., Strandberg B., Daneholt B. (1986). Three-dimensional structure of a specific pre-messenger RNP particle established by electron microscope tomography. *Nature* **319**, 560-564.
- Smith M. J., Hough B. R., Chamberlain M. E., Davidson E. H. (1974). Repetitive and non-repetitive sequence in sea urchin heterogeneous nuclear RNA. *J. Mol. Biol.* **85**, 103-126.
- Spritz R. A. and nine others. (1981). Base substitution in an intervening sequence of a β^+ -thalassemic human globin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 2455-2459.
- Strub K., Birnstiel M. L. (1986). Genetic complementation in the

- Xenopus* oocyte: Co-expression of sea urchin histone and U7 RNAs restores 3' processing of H3 pre-mRNA in the oocyte. *EMBO J.* **5**, 1675–1682.
- Tamkun J. W., Schwartzbauer J. E., Hynes R. O. (1984). A single rat fibronectin gene generates three different mRNAs by alternative splicing of a complex exon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 5140–5144.
- Tatei K., Takemura K., Mayeda A., Fujiwara Y., Tanaka H., Ishimura A., Oshima Y. (1984). U1 RNA-protein complex preferentially binds to both 5' and 3' splice junction sequences in RNA or singlestranded DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 6281–6285.
- Tazi J., Alibert C., Temsamani J., Reveillaud I., Cathala G., Brunel C., Jeanteur P. (1986). A protein that specifically recognizes the 3' splice site of mammalian pre-mRNA introns is associated with a small ribonucleoprotein. *Cell* **47**, 755–766.
- Topp W., Hall J. D., Rifkin D., Levine A. J., Pollack R. (1977). The characterization of SV40-transformed cell lines derived from mouse teratocarcinoma: Growth properties and differentiated characteristics. *J. Cell Physiol.* **93**, 269–276.
- Tsai S. Y., Tsai M.-J., Lin C.-T., O'Malley B. W. (1979). Effect of estrogen on ovalbumin gene expression in differentiated nontarget tissues. *Biochemistry* **18**, 5726–5731.
- Unwin P. N. T., Mulligan R. A. (1982). A large particle is associated with the perimeter of the nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* **93**, 63–75.
- Wickens M., Stephenson P. (1984). Role of the conserved AAUAAA sequence: Four AAUAAA point mutants prevent 3' end formation. *Science* **226**, 1045–1051.
- Wold B. J., Klein W. H., Hough-Evans B. R., Britten R. J., Davidson E. H. (1978). Sea urchin embryo mRNA sequences expressed in nuclear RNA of adult tissues. *Cell* **14**, 941–950.
- Zeitlin S., Efstratiadis A. (1984). In vivo splicing of the rabbit β -globin pre-mRNA. *Cell* **39**, 589–602.
- Zeitlin S., Parent A., Silverstein S., Efstratiadis A. (1987). Pre-mRNA splicing and the nuclear matrix. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 111–120.

Глава 14

Трансляционная и посттрансляционная регуляция процессов развития

Мы не должны игнорировать тот факт, что каузальное исследование организмов является одной из наиболее сложных, если не самой сложной проблемой, которую пытался решить человеческий интеллект, и что это исследование, подобно любой другой каузальной науке, никогда не может быть завершено, так как каждая вновь установленная причина только поднимает новые вопросы о причине данной причины.

ВИЛЬГЕЛЬМ РУ (1894)

У посыльного нет отдыха до тех пор, пока послание не вручено.

ДЖОЗЕФ КОНРАД (1920)

ТРАНСЛЯЦИОННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ РАЗВИТИЯ

После транскрипции, процессинга и выхода мРНК из ядра необходима ее трансляция, чтобы получить белок, закодированный в геноме. Из этой главы мы узнаем, что регуляция на уровне трансляции представляет собой исключительно важный механизм контроля экспрессии генов. В данном случае мРНК уже образована, но она может транслироваться или не транслироваться в зависимости от определенных условий в клетке. Таким образом, контроль экспрессии генов на уровне трансляции может использоваться, когда нужен немедленный всплеск синтеза белка (как мы увидим, это происходит сразу после оплодотворения яйца) или в качестве механизма тонкой регуляции, обеспечивающей синтез строго определенного количества белка на имеющемся запасе мРНК (например, при синтезе гемоглобина). Мы узнаем также, что контроль на уровне трансляции осуществляется несколькими путями и в различных клетках используются разные пути.

Механизм трансляции у эукариот

Трансляция – это процесс, с помощью которого информация, содержащаяся в нуклеотидной последовательности мРНК, управляет синтезом конкретного полипептида. Этот процесс можно разделить на три этапа: инициацию, элонгацию и терминацию (рис. 14.1). На первом этапе – инициации – происхо-

дит присоединение первой аминоацил-транспортной РНК и мРНК к рибосоме. Единственной транспортной РНК (тРНК), способной к инициации трансляции, является особая тРНК (тРНК_i), которая несет аминокислоту метионин. Как показано на рис. 14.2, первые реакции вызывают образование **иницирующего комплекса**, состоящего из метиониновой инициаторной тРНК, связанной с 40S («малой») субъединицей рибосомы. Эта Мет-тРНК_i узнается **эукариотическим фактором инициации 2 (эФИ2)**, который присоединяет ее к 40S-субъединице рибосомы. Отметим, что присоединение происходит в отсутствие мРНК. Следующей добавляется мРНК. **Кэп-связывающий белок** присоединяется к 7-метилгуанозину кэп-группы на 5'-конце мРНК, а эукариотические факторы инициации 4А и 4В прикрепляются к кэп-связывающему белку или рядом с ним. В отсутствие кэп-группы связывание мРНК с рибосомной субъединицей неполноценное (Shatkin, 1976, 1985). Рибосомная 40S-субъединица перемещается вдоль мРНК, пока не достигает кодона АУГ в правильном окружении. Было показано, что не каждый АУГ-кодон подходит для этого (Kozak, 1986). Для того чтобы остановить рибосомную 40S-субъединицу и инициировать трансляцию, важны также нуклеотиды вокруг АУГ. С помощью мутирования клонированных генов и анализа трансляции их РНК было обнаружено, что «оптимальной» является последо-

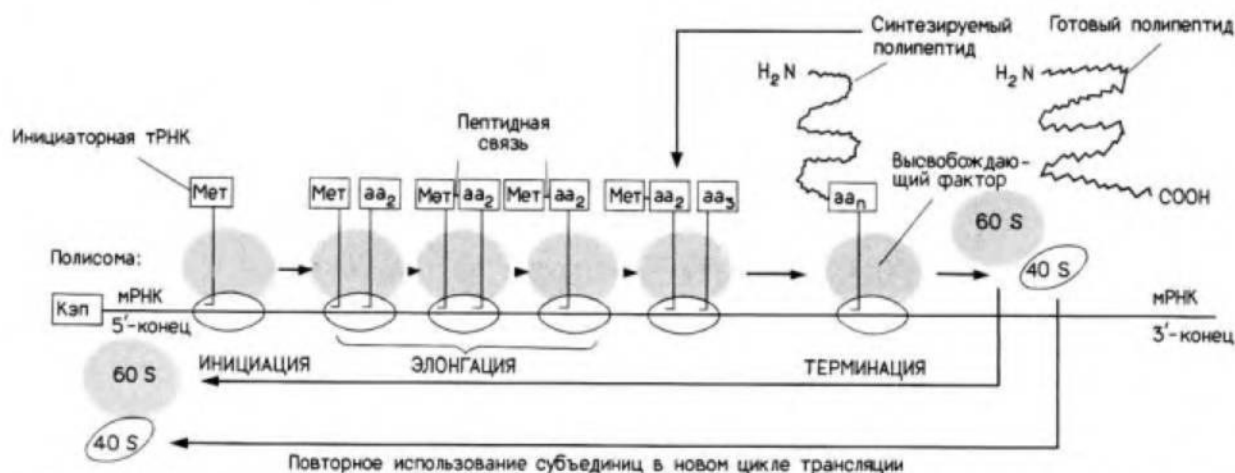


Рис. 14.1. Схема этапов трансляции у эукариот. На стадии инициации собираются вместе рибосомные субъединицы 40S (светлые) и 60S (серые), мРНК и инициаторная тРНК, которая находится в комплексе с аминокислотой метионином (Met). В ходе элонгации к полисоме доставляются аминокислоты, между которыми образуются пептидные связи. Последовательность аминокислот в растущем белке определяется последовательностью нуклеиновых кодонов в мРНК. После образования в белке последней пептидной связи один из кодонов УАГ, УГА или УАА сообщает о терминеции трансляции. Рибосомные субъединицы и мРНК могут использоваться в новом цикле трансляции.

вательность АЦЦАУГГ. Мутации среди фланкирующих нуклеотидов могут снижать трансляцию в 20 раз. Важность фланкирующей последовательности наблюдалась также *in vivo*. Имеется сообщение (Morle et al., 1985) о больном α -талассемией (дефицит α -глобиновых субъединиц), вызванной изменением последовательности АЦЦАУГГ на ЦЦЦАУГГ.

При связывании 40S-субъединицы с АУГ в мРНК инициаторная тРНК располагается над АУГ-кодоном. Только после правильного размещения мРНК на малой рибосомной субъединице может присоединиться рибосомная («большая») 60S-субъединица.

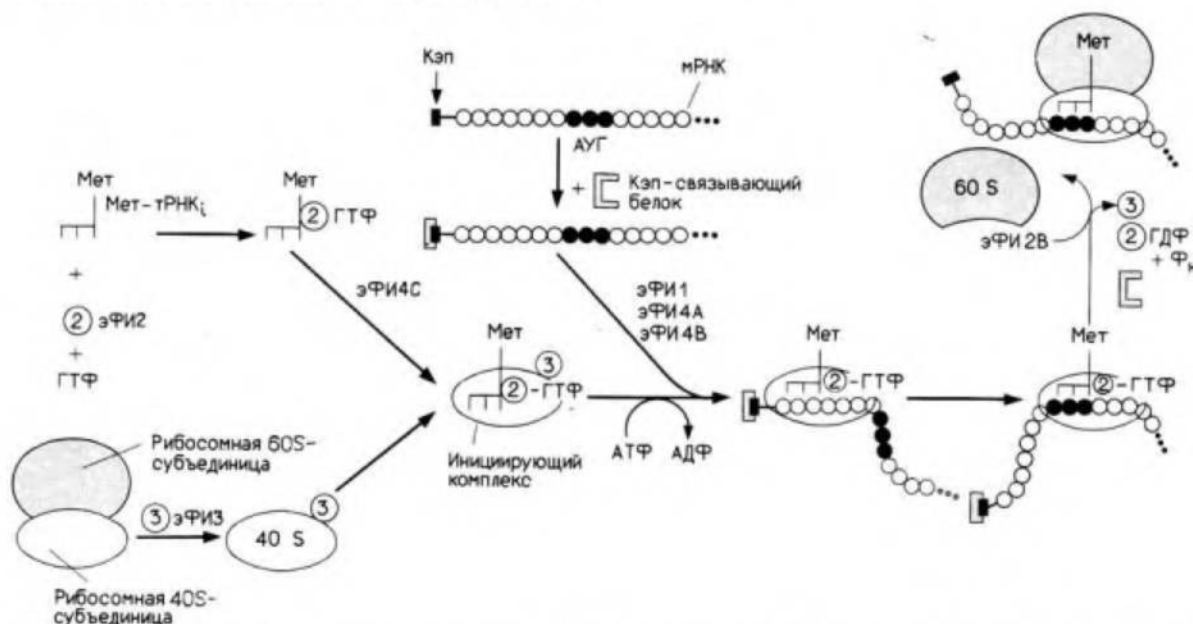


Рис. 14.2. Стадия инициации трансляции у эукариот. Начальный комплекс образуется в результате объединения активированной инициаторной тРНК и рибосомной 40S-субъединицы; этот процесс катализируется ГТФ и эукариотическими факторами инициации (эФИ) 2 и 3. После формирования комплекса на нем с помощью белка, связывающего кэп-группу и АТФ, встает на свое место рибосомная 60S-субъединица. Эти поздние этапы катализируются эФИ1, 4 и 5. (По Hershey, 1980; Shatkin, 1985.)

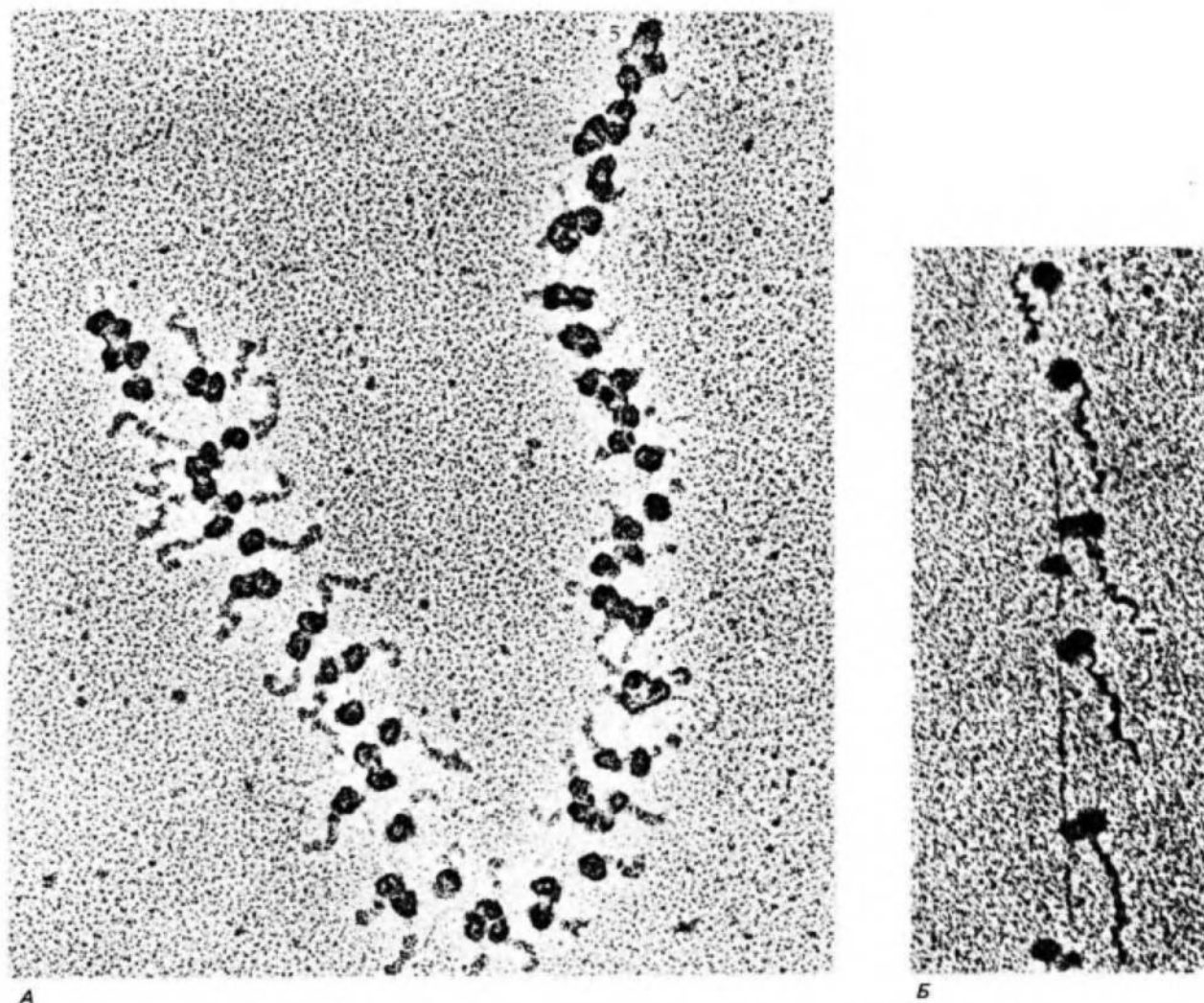


Рис. 14.3. Индивидуальная полисома, транскрибирующая гигантскую мРНК пуфа BR2 из клеток слюнных желез *Chironomus tentans*. А. Электронная микрофотография полисомы, состоящей из 74 рибосом. Можно видеть синтезируемые белки, выходящие из рибосом и растущие по мере движения рибосом от 5'-к 3'-концу мРНК. Около 3'-конца располагаются рибосомы, от которых белок уже отделился. Б. Фотография полисомы при большем увеличении; полисома была растянута в ходе приготовления препарата. Можно видеть расположение мРНК относительно рибосомных субъединиц и синтезируемого полипептида. (Из Francke et al., 1982; фотография с любезного разрешения J. E. Edstrom.)

Элонгация заключается в последовательном присоединении молекул аминоксил-тРНК к рибосоме и образовании пептидных связей между аминокислотами по мере того, как они последовательно отдают свои тРНК-переносчики (рис. 14.1). После соединения аминокислот друг с другом рибосома перемещается по мРНК, экспонируя новые кодоны для связывания тРНК. Это позволяет другой рибосоме инициировать трансляцию на 5'-конце мРНК и начать свое перемещение. Таким образом, с любой мРНК связано обычно несколько рибосом. Эту структуру называют поэтому полирибосомой или,

что более принято, **полисомой** (рис. 14.3). Терминация синтеза белка происходит, когда на рибосоме экспонируется один из кодонов мРНК – УАГ, УАА или УГА. Эти триплеты нуклеотидов (называемые кодонами терминации) не узнаются молекулами тРНК и, следовательно, не кодируют ни одной аминокислоты. Однако их узнают сбрасывающие факторы, которые гидролизуют связь пептида с последней тРНК, освобождая его от рибосомы. Рибосома разделяется на две субъединицы, и цикл трансляции начинается снова.

Хотя 3'-поли(А)-хвосты молекул мРНК не транс-

лируются, они, по-видимому, увеличивают эффективность трансляции тех мРНК, у которых они имеются. Как правило, пока мРНК находится в цитоплазме, ее поли(А)-хвост постепенно укорачивается, и если размеры его станут ниже критического, то способность мРНК к трансляции существенно снижается (Littauer, Soreq, 1982). В некоторых случаях экспрессия различных мРНК в цитоплазме может регулироваться с помощью дифференциального укорачивания поли(А)-хвостов. Этот механизм наблюдали в слюнных железах личинки *Drosophila* (Restifo, Guild, 1986) и в ооцитах *Xenopus* (Dworkin, Dworkin-Rastl, 1985). У миксомицеты *Dictyostelium* (развитие которого рассмотрено в гл. 1) и двусторчатого моллюска *Spisula* дифференциальное укорачивание поли(А)-хвостов играет решающую роль в их жизненном цикле. При переходе миксомицеты от вегетативного роста (амеба) к развитию (плодовое тело) транскрибируется новый набор мРНК. Одновременно резко укорачиваются поли(А)-хвосты запасенных мРНК, специфичных для вегетативной стадии. В результате новосинтезированные мРНК транслируются, а запасенные мРНК – нет. Высказано предположение, что поли(А)-хвост каким-то образом поддерживает трансляцию (Palatnik et al., 1984). Эта идея согласуется с наблюдениями, что добавленная экзогенная поли(А) ингибирует трансляцию мРНК с такими хвостами (Jacobson, Favreau, 1983). Сходным образом после оплодотворения ооцита *Spisula* поли(А)-хвосты в молекулах мРНК, транслируемых в ооците, сильно укорачиваются, тогда как в тех мРНК, которые будут транслироваться у ранних зародышей (и которые не транслировались в ооците), удлиняются (Rosenthal, Ruderman, 1987).

Контроль на уровне трансляции при координированном синтезе белка: продукция гемоглобина

Одной из основных проблем генетической регуляции является координированный синтез нескольких продуктов с разных участков генома. Когда развивающийся эритроцит синтезирует гемоглобин, необходимо, чтобы α -глобиновые цепи, β -глобиновые цепи и молекулы гема производились соответственно в соотношении 2:2:4 (рис. 14.4). Любое существенное отклонение от этого соотношения приводит к тяжелым заболеваниям.

Результаты недавних исследований показали, что пропорциональный синтез компонентов гемоглобина регулирует молекула гема. Достигается это двояким образом. Во-первых, избыток гема (т.е. гема, который не связан с белком, подобным глобину) будет выключать свой собственный синтез (Karibian, London, 1965). Осуществляется выключе-



Рис. 14.4. Структура гемоглобина человека (взрослая форма), состоящего из четырех полипептидных цепей (двух α и двух β) и четырех молекул гема. (По Dickerson, Geis, 1983.)

ние синтеза посредством инактивации δ -аминолевулинатсинтазы (DALA-синтазы), первого фермента на пути продукции гема (рис. 14.5). Таким образом, когда количество гема превосходит количество молекул, способных присоединить его, дальнейшая продукция гема прекращается. Во-вторых, избыток гема стимулирует синтез глобинов (Gribble, Schwartz, 1965; Zucker, Schulman, 1968). Если гем (в виде своей окисленной формы – гемина) добавляют к бесклеточной системе трансляции, в состав которой входят факторы, необходимые для трансляции мРНК (табл. 14.1), то синтез глобина значительно увеличивается (рис. 14.6). Следовательно, если для связывания гема не хватает глобинов, то избыток гема выключает свой собственный синтез и стимулирует усиленную продукцию глобинов.



Рис. 14.5. Регуляция синтеза гема по типу обратной связи. (По Harris, 1975.)

Таблица 14.1. Компоненты бесклеточной системы трансляции в лизате ретикулоцитов кролика

Компонент	Концентрация (в 100 мкл)
Лизат ретикулоцитов (1:1)	50 мкл
Буфер <i>tris</i> -HCl (pH 7.6)	10 mM
АТФ	1 mM
ГТФ	0.2 mM
Креатинфосфат	5 mM
Креатинфосфокиназа	10 мкг
Ацетат магния	2 mM
KCl	76 mM
Пропорциональная смесь аминокислот	6–170 мкМ
[¹⁴ C]-лейцин	0.8 мкКи
«Холодный» лейцин	26 мкМ
Гемин	10–30 мкМ
H ₂ O до общего объема реакционной смеси 100 мкл	

Источник: London et al., 1976.

В нескольких лабораториях пытались выяснить, каким образом такая маленькая молекула, какой является гем, может регулировать синтез белка. В 1972 г. Адамсон и др. (Adamson et al., 1972) обнаружили, что стимулирующий эффект гема на синтез глобинов может быть имитирован путем добавления к системе трансляции слабосвязанных рибосомных белков. Поскольку такие смеси богаты факторами инициации трансляции, каждый фактор испытывали в отдельности. Оказалось, что эукариоти-

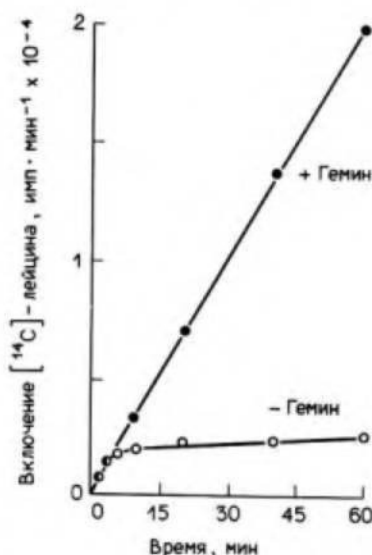


Рис. 14.6. Трансляция глобиновой мРНК в бесклеточной системе синтеза белка из ретикулоцитов кролика. Добавление гема вызывает резкое увеличение синтеза белка. (Из London et al., 1976.)

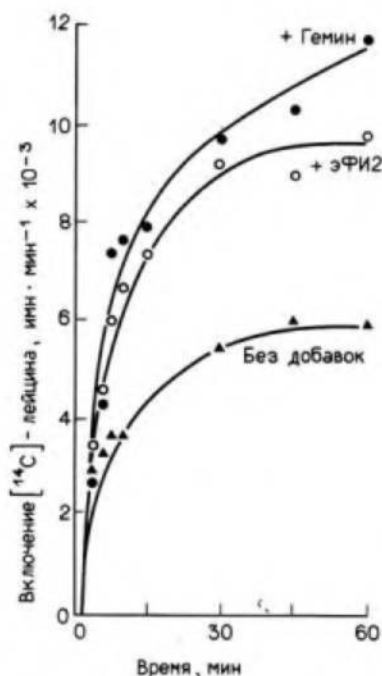


Рис. 14.7. Влияние добавки экзогенного эукариотического фактора инициации 2 к бесклеточной системе трансляции из ретикулоцитов кролика. Добавленный эФИ2 увеличивал синтез белка до уровня, близкого к наблюдаемому в системе, стимулированной геминим. (По Clemens et al., 1974.)

ческий фактор инициации 2 (эФИ2) восстанавливает синтез белка в трансляционной системе из лизатов, дефицитных по гему (рис. 14.7). Этот фактор инициации отвечает за связывание инициаторной тРНК и присоединение ее к рибосомной 40S-субъединице.

Какова взаимосвязь между гемом и эФИ2? Чтобы ответить на этот вопрос, лизаты, дефицитные по гему, добавляли к трансляционным системам, содержащим гем (Levin et al., 1976; Ranu et al., 1976). Было обнаружено, что добавка порции лизата, дефицитного по гему, действительно подавляет синтез глобинов в системе трансляции. Это наблюдение указывало на присутствие ингибитора. Более того, оказалось, что эта ингибирующая фракция имеет ферментативную активность. Она содержит киназу, способную фосфорилировать эФИ2.

Фосфорилирование эФИ2 в конечном итоге останавливает трансляцию. В норме, после того как рибосомные субъединицы объединяются, эФИ2 высвобождается в виде комплекса с ГДФ (Rayschaudhuri et al., 1985). Это высвобождение осуществляется с помощью эФИ-2В (называемого иногда фактором циклов или фактором обмена гуанинового нуклеотида), который присоединяется к эФИ2 и удаляет его с рибосомы. Однако, когда этот фактор циклов присоединяется к фосфорилирован-

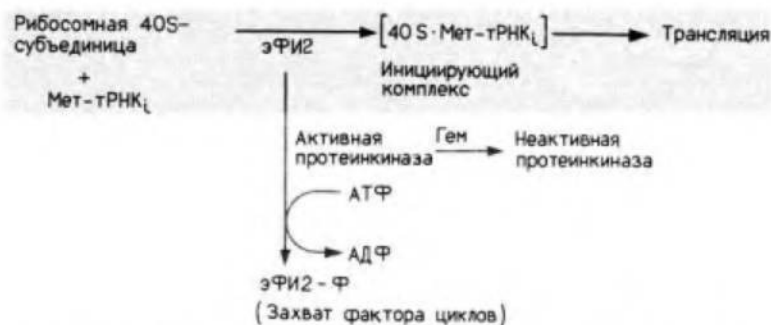


Рис. 14.8. Схема трансляционного контроля синтеза глобинов. Эукариотический фактор инициации 2 истощается в результате фосфорилирования (протеинкиназой) до тех пор, пока гем не инактивирует протеинкиназу.

ной форме эФИ2, он остается связанным с эФИ2 и комплекс с эФИ2 не уходит с рибосомы (Thomas et al., 1985; Gross et al., 1986). В результате весь фактор циклов (концентрация которого в 10–20 раз ниже, чем эФИ2) оказывается захваченным в таких неактивных комплексах. Циркуляция эФИ2 прекращается, и синтез белка останавливается. Добавление фактора циклов к лизатам, дефицитным по гему, приводит к восстановлению синтеза белка до уровня трансляционных систем, содержащих гем (Grace et al., 1984).

В итоге регуляцию синтеза глобинов гемом можно представить следующим образом (рис. 14.8).

1. В отсутствие гема специфическая протеинкиназа фосфорилирует фактор инициации 2.
2. Фосфорилированный фактор инициации 2 связывается со своим фактором циклов и не высвобождает его. В конечном счете весь фактор циклов иммобилизуется в этих комплексах. Комплекс эФИ2–эФИ-2В остается связанным с рибосомой, и трансляция останавливается.
3. Избыточный гем способен присоединиться к протеинкиназе, инактивируя ее (Fagard, London, 1981). Инактивированная киназа не будет фосфорилировать эФИ2, поэтому трансляция не останавливается. Таким образом, синтез глобинов продолжается до тех пор, пока присутствует гем.

Трансляционный контроль синтеза глобинов не ограничивается этим. Как отмечалось в гл. 12, в диплоидной клетке имеются четыре активных α -глобиновых гена и лишь два активных β -глобиновых гена. Если бы каждый ген транскрибировался и транслировался с одинаковой скоростью, то следовало ожидать, что количество α -глобиновых молекул вдвое превысит количество β -глобиновых молекул. Этого, естественно, не происходит. Обнаруживается отношение 1,4:1 для α -мРНК: β -мРНК, но 1:1 для белков (Lodish, 1971). Таким образом, уравнивание количеств белков обусловлено регуляцией на уровне трансляции.

Полагают, что это уравнивание происходит на стадии инициации трансляции (Kabat, Chappell,

1977). Оказалось, что α -глобиновая мРНК конкурирует с β -глобиновой мРНК за факторы инициации, но β -глобиновая мРНК является лучшим конкурентом. β -Глобиновая мРНК узнавалась более эффективно факторами инициации и поэтому транслировалась с большей частотой. Если эти две мРНК присутствовали в равных количествах и при лимитирующем количестве факторов инициации, то лишь 3% производимого белка составлял α -глобин. Однако если нефракционированную мРНК (α - и β -глобиновую мРНК из лизированных клеток) добавляли к избытку таких факторов, то все молекулы мРНК транслировались с одинаковой эффективностью и итоговое отношение α - и β -глобинов составляло 1,4:1. Результаты недавних экспериментов (Ray et al., 1983; Sarkar et al., 1984) косвенно свидетельствуют о том, что в качестве фактора инициации, ответственного за дискриминацию между двумя типами глобиновых мРНК, выступает кэп-связывающий белок. Хотя до сих пор неясно, как эта дискриминация осуществляется, известно, что на эффективность трансляции влияет вторичная структура 5'-лидерной последовательности (Pelletier, Sonnenberg, 1985). Как видно из рис. 14.9, 5'-концы α - и β -глобиновых мРНК существенно различаются. Таким образом, правильное соотношение α -глобина, β -глобина и гема устанавливается на стадии инициации трансляции. Итак, синтез гемоглобина подвержен регуляции на уровнях транскрипции и процессинга РНК, однако итоговая молекула формируется при тонкой координации на уровне трансляции.

Селективная деградация мРНК

Другой механизм трансляционной регуляции касается типов мРНК с различной продолжительностью жизни. Для стабильной мРНК, такой, как β -глобиновая, время полужизни составляет около 17 ч, для молекул же мРНК разнообразных факторов роста время полужизни составляет меньше 30 мин. Следовательно, количество белка, произведенного с одной молекулы глобиновой мРНК, должно быть существенно больше того, что произ-

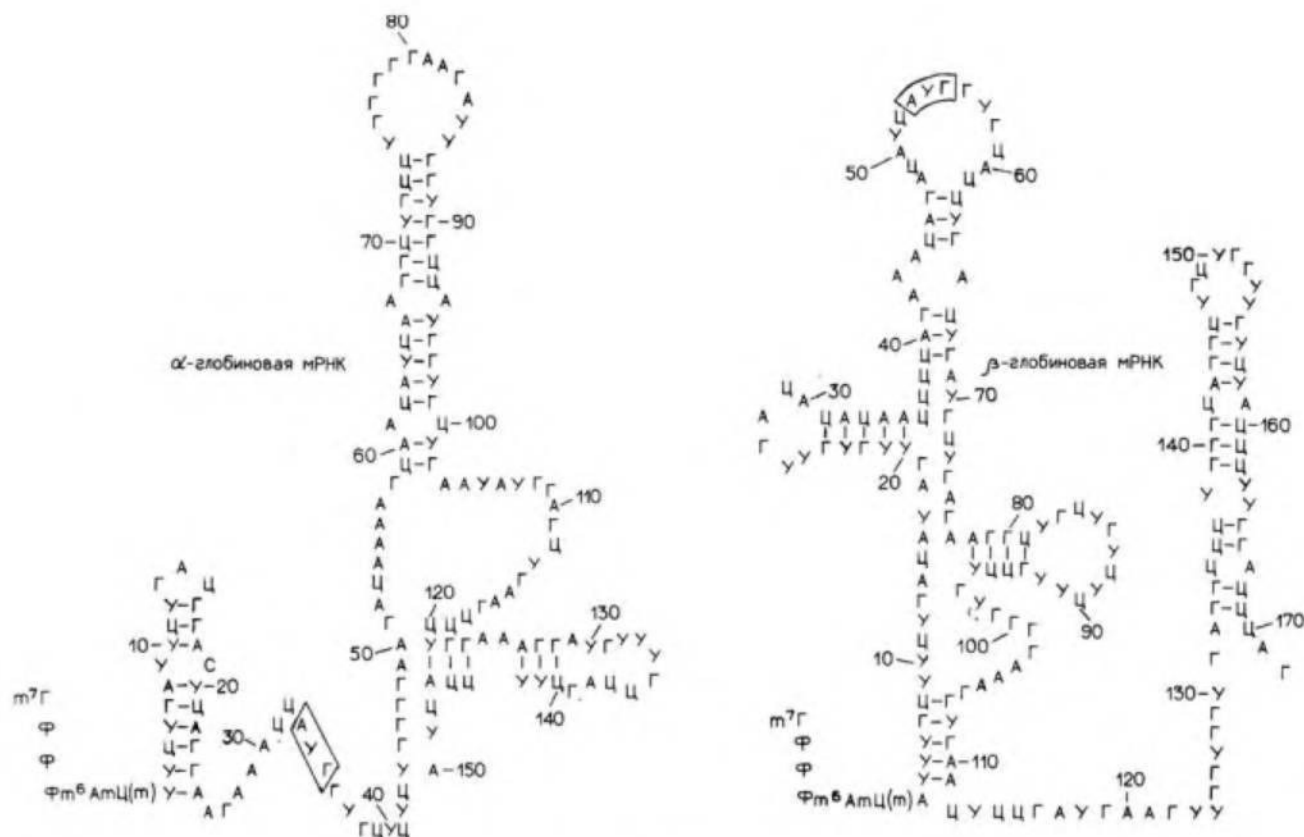


Рис. 14.9. Возможные вторичные структуры 5'-концов α -глобиновой и β -глобиновой цепей мыши. (По Pavlakis et al., 1980.)



Рис. 14.10. Регуляция продолжительности жизни мРНК с помощью последовательности в 3'-нетранслируемой области. А. 3'-конец β -глобинового гена кролика был модифицирован вставкой фрагмента длиной 62 п.о., полученного из 3'-конца гена КСФ-г.м человека или аналогичной последовательности, в которой несколько АТ-пар были заменены ГЦ-парами (указаны на сером фоне). Б. Клоны инъецировали в культивируемые клетки мыши и через 30 ч определяли наличие мРНК с помощью инкубации клеточных экстрактов с ^{32} Р-меченной ДНК, комплементарной к 5'-концу мРНК. Если β -глобиновая мРНК кролика присутствует, то радиоактивная кДНК будет связываться с ней и поэтому будет устойчива к нуклеазе S1 (которая гидролизует только одноцепочечные нуклеиновые кислоты). Если мРНК отсутствует, то добавленная нуклеаза S1 будет расщеплять зонд до мононуклеотидов и радиоактивность связываться не будет. Полученные препараты фракционировали в геле и делали радиоавтографы. Дорожка 1: экстракт из клеток, включивших клонированный β -глобиновый ген кролика дикого типа (WT). Дорожка 2: экстракт из клеток, включивших β -глобиновый ген кролика с АТ-богатым 3'-концом (свидетельствует об отсутствии мРНК через 30 ч). Дорожка 3: экстракт из клеток, включивших β -глобиновый ген кролика с ГЦ-замещенным 3'-концом (свидетельствует о присутствии стабильной мРНК через 30 ч). Ген и зонд для микроглобулина β_2 (синтезирующего долгоживущую мРНК) использовали в качестве контроля. (Из Shaw, Kamen, 1986; фотография с любезного разрешения авторов.)

водится с одной молекулы мРНК фактора роста. Основным элементом, контролирующим время жизни мРНК, находится, по-видимому, в 3'-нетранслируемой области мРНК. При этом молекулы эпидермальной РНК содержат одну или несколько АУ-богатых последовательностей в этой области. В одном из опытов АТ-богатый участок длиной в 51 пару оснований из 3'-нетранслируемой области гена для фактора роста КСФ-г_м был встроен в 3'-нетранслируемую область β-глобинового гена кролика (рис. 14.10; Shaw, Kamen, 1986). Время полужизни полученной глобиновой мРНК составляло менее 30 мин. Аналогичная последовательность, но содержащая 14 остатков Г и Ц, была встроена в качестве контроля в другой β-глобиновый ген. Соответствующая глобиновая мРНК имела обычное время полужизни. Создается впечатление, что продолжительность существования конкретной мРНК закодирована в 3'-нетранслируемой области этой мРНК.

Способность к дифференциальной деградации различных мРНК имеет критическое значение для клеточных функций. Например, ген *c-fos* кодирует ядерный белок, необходимый для деления нормальных фибробластов (Holt et al., 1986). Подобно мРНК фактора роста КСФ-г_м, мРНК для *c-fos* имеет протяженную 3'-нетранслируемую область, богатую АУ-последовательностями. Если эта область делетирована (экспериментально или при спонтанных мутациях), то время полужизни соответствующей мРНК увеличивается. Следовательно, производится больше белка *c-fos* и клетка непрерывно стимулируется к делению. В результате возникает опухоль из клеток, в которых мРНК гена *c-fos* лишена АУ-богатой 3'-области (Meijlink et al., 1985).

Трансляционный контроль ооцитных мРНК

Данные, свидетельствующие о материнской регуляции раннего развития

У большинства видов животных экспрессия генов диплоидного ядра происходит не сразу. Данные о том, что раннее развитие контролируется факторами, запасенными или синтезированными в ооците, получены в ряде экспериментов на рубеже нашего века (см. обзор Davidson, 1976). Результаты этих экспериментов отчетливо показали доминантность материнских признаков на начальных стадиях эмбриогенеза и переключение на отцовские или гибридные характеристики только в более позднем развитии. О таких долговременных материнских влияниях мы упоминали при обсуждении ориентации дроблений у зародышей улитки, у которых

Таблица 14.2. Данные Дриша по материнскому контролю числа клеток первичной мезенхимы в гибридных зародышах морского ежа

Яйцеклетки	Спермин	Среднее число клеток первичной мезенхимы (в скобках указан разброс значений)
<i>Echinus</i>	× <i>Echinus</i>	55 (±4)
<i>Spherechinus</i>	× <i>Spherechinus</i>	33 (±4)
<i>Spherechinus</i>	× <i>Echinus</i>	35 (±5)
<i>Strongylocentrotus</i>	× <i>Strongylocentrotus</i>	49 (±3)
<i>Spherechinus</i>	× <i>Strongylocentrotus</i>	33 (±3)

Источник: Davidson, 1976.

цитоплазма ооцита содержит фактор, управляющий поворотами плоскостей дробления в правом или левом направлении.

В 1898 г. Ханс Дриш скрестил два вида морских ежей и обнаружил, что среднее число первичных клеток мезенхимы в гибриде зависит исключительно от вида, давшего яйцо (табл. 14.2). В сходном эксперименте яйцеклетки морского ежа *Cidaris* оплодотворяли спермой морского ежа *Lytechinus* (Tennant, 1914). При этом было обнаружено, что в образующихся бластомерах сохраняются все хромосомы, а формирование архентерона и время образования мезенхимы соответствуют материнскому типу развития (табл. 14.3). Отцовские гены проявлялись впервые при закладке скелетных клеток.

Таблица 14.3. Данные Теннанта по контролю этапов ранней гаструляции в гибридных зародышах морского ежа

Виды морского ежа	Инвагинация архентерона	Образование мезенхимы, ч	Источник клеток первичной мезенхимы
<i>Cidaris</i> (самка)	20–33	23–26 (после инвагинации)	Верхушка архентерона
<i>Lytechinus</i> (самец)	9	8 (до инвагинации)	Основание и боковые части архентерона
Гибрид			
<i>Cidaris</i> (самка) × <i>Lytechinus</i> (самец)	20	24 (после инвагинации)	Основание и боковые части архентерона

Источник: Davidson, 1976.

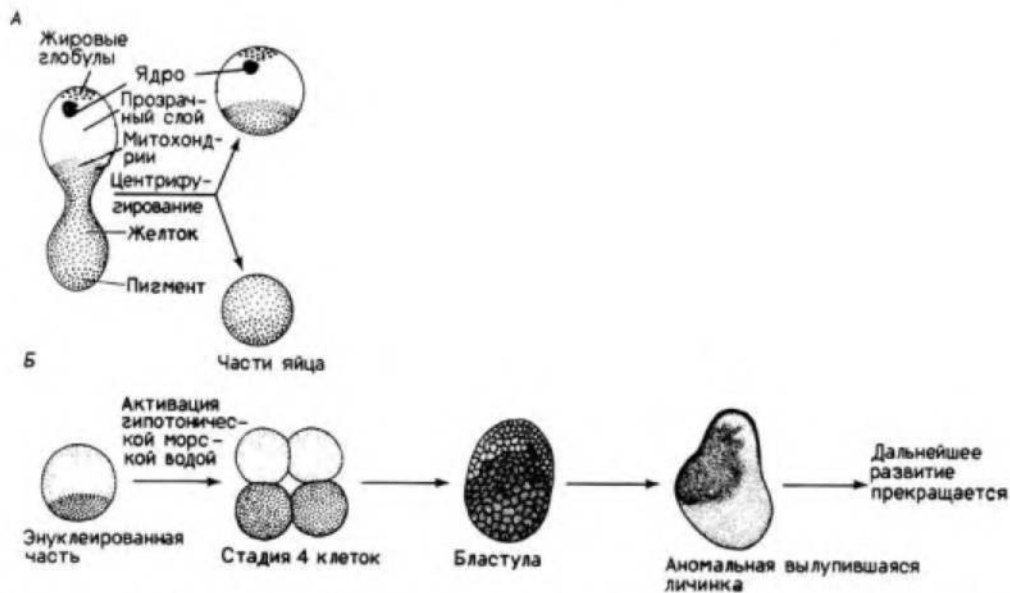


Рис. 14.11. Дробление в отсутствие ядра. А. Физическое энуклеирование ооцита *Arbacia* с помощью центрифугирования в растворе сахарозы. Б. Развитие энуклеированной части ооцита в партеногенетические мерогоны, лишенные ядер. Обычно энуклеированные ооциты претерпевают аномальное дробление, однако некоторые энуклеированные ооциты развиваются до стадии бластулы; иногда даже в отсутствие продуктов ядерного синтеза вылупляется аномальная личинка. (По Harvey, 1940.)

Вторая группа данных, свидетельствующих о материнской регуляции раннего развития, получена в работах по энуклеации. Если после оплодотворения яйца из него удалить ядро, то можно выяснить, как далеко проходит развитие в отсутствие синтеза новых мРНК. Энуклеация проводилась с помощью физических, химических и генетических методов. Физическую энуклеацию ооцита осуществила Харвей (Harvey, 1940). Она помещала неоплодотворенные яйцеклетки морского ежа в раствор сахарозы, имеющий ту же плотность, что и сами яйцеклетки. При центрифугировании суспензия расслаивалась, и в конечном счете яйцеклетки разрывались на две глобулы (рис. 14.11, А). Легкая часть содержала ядро, а тяжелая часть оказывалась энуклеированной. Затем Харвей партеногенетически активировала энуклеированные части, поместив их в гипотоническую морскую воду. Эти части («партеногенетические мерогоны») дробились, образовывали аномальную бластулу (лишенную бластоцеля) и благополучно выклеивались (рис. 14.11, Б). Дальше развитие прекращалось. Результаты аналогичных экспериментов с использованием ооцитов лягушки также показали, что дробление может происходить даже при полном отсутствии хромосом (в том случае, если в икру были инъектированы центриоли для компенсации тех, которые в норме поставляются спермием). В этом случае также возникает аномальная бластула. Опыты по физической энуклеации показывают, что определенные яйцеклетки даже

в отсутствие ядра способны проходить в своем развитии стадию средней бластулы.

Запасенные мРНК

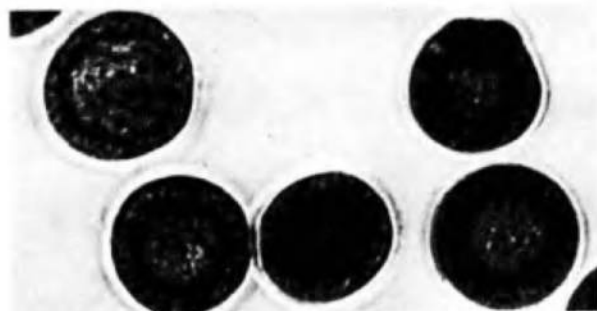
Данные о том, что ооцит контролирует раннее развитие благодаря запасенной им мРНК, были впервые получены двумя группами исследователей (Brachet et al., 1963; Denny, Tyler, 1964). Результаты этих исследований показали, что энуклеированные и активированные части яйцеклеток морского ежа содержат РНК и могут синтезировать белки со скоростью, сравнимой со скоростью синтеза в нормально оплодотворенных яйцах. В энуклеированных ооцитах транскрипции происходить не может, следовательно, для синтеза белков в них должна использоваться запасенная мРНК. Было показано, что прирост в белковом синтезе не может быть обусловлен транскрипцией митохондриальной ДНК ооцита (Craig, Piatigorsky, 1971). Представляется, что ооцит создал запас мРНК, которые не транслируются до оплодотворения.

Мягкие способы энуклеации стали возможны, когда было открыто, что антибиотик актиномицин D ингибирует синтез РНК, и транскрипция может быть выключена путем помещения свежее оплодотворенной яйцеклетки в раствор этого антибиотика. Когда ооциты морского ежа обрабатывали актиномицином D в концентрации, достаточной для по-

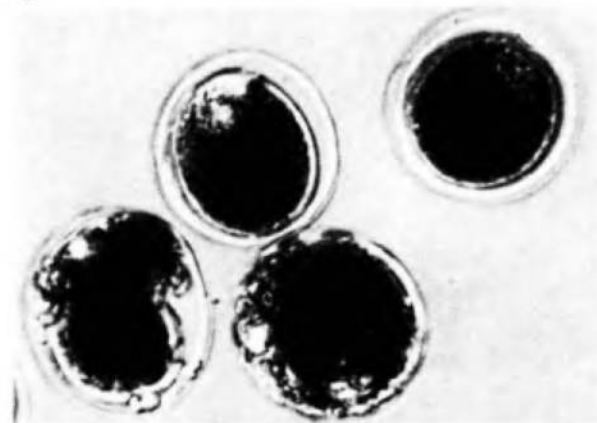


А

Рис. 14.12. Влияние ингибиторов синтеза белка на развитие морского ежа *Lytechinus*. А. Контрольная личинка на стадии плутеуса. Б. Развитие прекращается на стадии бластулы, если транскрипция новых мРНК подавлена актиномицином Д. В. Развитие прекращается на стадии одной клетки, если трансляция новых белков подавляется эметинном или циклогексимидом.



Б



В

давления синтеза РНК в ней на 94%, зародыши в своем развитии все еще достигали стадии бластулы (рис. 14.12, Б) (Gross, Cousineau, 1964). То, что это развитие зависит от запасенных мРНК, а не от предварительно синтезированных белков, было показано с помощью обработки оплодотворенных ооцитов эметинном или циклогексимидом. Эти антибиотики ингибируют трансляцию, и зародыши, оплодотворенные в присутствии этих ингибиторов, не могут развиваться вовсе (рис. 14.12, В).

В ряде исследований был продемонстрирован всплеск белкового синтеза вскоре после оплодотворения. Результаты экспериментов Гросса и его коллег с использованием актиномицина Д показали, что в химически знклеированных зародышах синтез белка после оплодотворения увеличивается точно так же, как в контрольных (рис. 14.13). Однако спустя 6–10 ч в обработанных зародышах наблюдается спад белкового синтеза и второй всплеск белкового синтеза на стадии бластулы у них не происходит. Молекулы мРНК для этого второго подъема синтеза белка транскрибируются в ядре. Таким образом, зародыши, обработанные актиномицином Д, могут развиваться вплоть до выклева на стадии бластулы, а далее развитие останавливается. Следовательно, запасенных мРНК ооцита

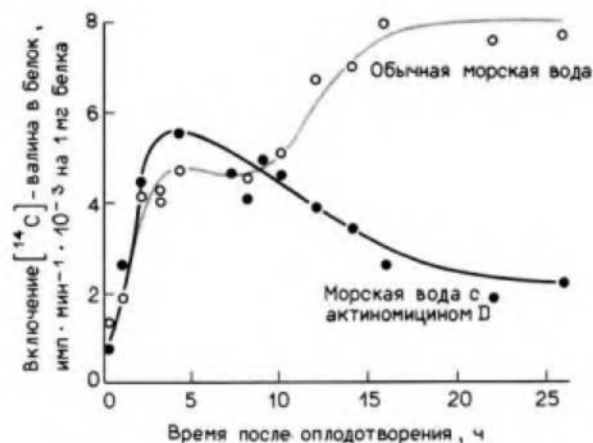


Рис. 14.13. Синтез белка у зародышей морского ежа *Arbacia punctulata*, оплодотворенных в присутствии или в отсутствие актиномицина Д. В течение первых нескольких часов сколько-нибудь существенного различия в скоростях синтеза новых белков не наблюдается. Всплеск синтеза новых белков, который начинается на стадии средней бластулы, связан с трансляцией новосинтезированных мРНК и не наблюдается у зародышей, развивающихся в присутствии актиномицина Д. (По Gross, Cousineau, 1964.)



Рис. 14.14. Материнский эффект « o »-мутации у аксолотля. После спаривания гетерозигот особи с генотипом « o/o » могут развиваться благодаря тому, что их матери имели аллель дикого типа. Самцы « o/o » стерильны. Однако у самок « o/o » могут образовываться мутантные ооциты, которые после оплодотворения останавливаются в развитии на стадии гастрюлы, даже если при оплодотворении сперматозоидом был внесен аллель дикого типа. (По Brothers, 1979.)

достаточно для обеспечения развития только до стадии вылупляющейся бластулы.

Опыты на амфибиях дали похожие результаты, правда, в этом случае стимулом для увеличения скорости синтеза белка оказалась овуляция яйца, а не его оплодотворение. В активированных энуклеированных ооцитах лягушки белки, синтезируемые вскоре после оплодотворения, продуцируются не только в соответствующих количествах, но и именно тех типов, что и в контрольных нормальных зародышах (Smith, Ecker, 1965; Ecker, Smith, 1971). В этом случае цитоплазма ооцита также оказывается «запрограммированной» для обеспечения процессов раннего развития даже в отсутствие ядра. В конечном счете в ядрах зародыша инициируется транскрипция, но даже эта транскрипция в эмбриональных ядрах должна быть активирована материнскими факторами ооцита. Эта концепция получила поддержку в исследованиях o -мутанта мексиканского аксолотля. o -Мутация, обусловленная материнским эффектом, заключается в том, что гомозиготные самки откладывают яйца, которые благополучно оплодотворяются и совершенно нормально развиваются до стадии позднего дробления и ранней бластулы (Briggs, Cassens, 1966). На стадии средней бластулы яйца, откладываемые самкой o/o , обнаруживают замедленный митоз. В таких зародышах образуется спинная губа blastopora, но дальнейшее развитие всегда останавливается во время гастрюляции (рис. 14.14). На стадии бластулы в ооцитах самок дикого типа начинается синтез новых белков (Malacinski, 1971). Однако в ооцитах

самок o/o на стадии бластулы не происходит этот всплеск белкового синтеза и набор белков оказывается идентичен тому, что продуцируют энуклеированные зиготы. В то время как в контроле (норме) на стадии поздней бластулы наблюдается интенсивный синтез РНК, в мутантных зародышах синтез РНК не обнаруживается вовсе или отмечается низкий уровень продукции РНК (рис. 14.15). Было показано, что у зародышей, полученных от самок o/o , отсутствует фактор, который активирует геном на стадии бластулы (Briggs, Cassens, 1966). Этот фактор можно было изолировать из цитоплазмы нормальных blastomeres или из ядерного сока премейотических ооцитов. Когда этот фактор инъецировали в ооциты от самок o/o , он предотвращал остановку развития на стадии гастрюлы, позволяя зародышу развиваться нормально.

Таким образом, для активации ядер амфибий нужен специфический фактор. В отсутствие такого фактора развитие продолжается только до той стадии, которая обеспечивается запасенными мРНК ооцита. У амфибий запасенного ооцитного материала достаточно, чтобы зародыш мог начать гастрюляцию. Однако дальше развитие без синтеза новых РНК идти не может.

Результаты опытов по физической, химической и генетической энуклеации ооцита с очевидностью свидетельствуют о том, что в его цитоплазме действительно существуют запасенные мРНК и что продукты этих мРНК обеспечивают раннее развитие зародыша.



Рис. 14.15. Включение [^3H]-уридина в РНК зародышей дикого типа и мутантных зародышей. Зародышей на стадии бластулы инкубировали в присутствии радиоактивного предшественника РНК в течение 3 ч, отмывали от метки, фиксировали, окрашивали и визуализировали с помощью радиоавтографии. А. Клетки нормальных зародышей имеют высокую радиоактивность, что свидетельствует о синтезе РНК. Б. Зародыши, полученные от самок, имеющих генотип «0/0». Зародыши окрашиваются, но существенного мечения не наблюдается, что указывает на низкий уровень или полное отсутствие транскрипции. (Из Carroll, 1974.)

Характеристика материнских мРНК

Эрик Дэвидсон и его коллеги оценили сложность ооцитной мРНК методом, аналогичным использованному ими для анализа сложности яРНК (гл. 13). РНК в большом избытке гибридизовали с денатурированной ДНК; было обнаружено, что значение

C_{0t} для 50%-ной гибридизации пропорционально количеству имеющихся различных РНК-последовательностей. С помощью этого анализа они подсчитали, что каждый ооцит (у представителей самых разнообразных типов животных) имеет различные последовательности в количестве, достаточном для приблизительно 1600 копий каждой из 20 000–50 000 типов РНК (Galau et al., 1976; Hough-Evans et al., 1977). Из клеток всех известных типов мРНК ооцита характеризуется наибольшей сложностью, и эта сложность отражает огромный потенциал ооцита к развитию. Однако лишь немногие из этих мРНК охарактеризованы. Использование бесклеточных систем трансляции и кДНК-зондов позволило идентифицировать в цитоплазме ооцита мРНК гистонов (Skoultschi, Gross, 1973) и мРНК тубулина (Raff et al., 1972). Очевидно, что продукты этих мРНК важны для образования хроматина и митотического веретена при дроблении.

Биохимические методы позволили идентифицировать мРНК для рибонуклеотидредуктазы (фермент, необходимый для образования дезоксирибонуклеотидов из запасенных рибонуклеотидов) и для фермента вылупления (фермент, который позволяет зародышам разрушать оболочки оплодотворения) (Raff, 1980). В ооцитах двустворчатых моллюсков рибонуклеотидредуктаза запасается необычным образом. Большая субъединица накапливается в виде белка в цитоплазме ооцита, а малая субъединица запасается в виде нетранслируемой материнской мРНК. Только после оплодотворения новосинтезированная малая субъединица может объединяться с предобразованной большой субъединицей, чтобы сформировать функциональный фермент (Standart et al., 1986). С помощью методов рекомбинантных ДНК удалось выделить запасенную мРНК для актина и других белков.

Небезынтересно, что некоторые запасенные мРНК распределены по ооциту неравномерно. Такое неравномерное распределение РНК-последовательностей мы наблюдаем в цитоплазме ооцитов улитки и оболочника, но такая же локализация наблюдается в ооцитах морского ежа и лягушки (Rodgers, Gross, 1978). И если, по данным некоторых авторов (Rebagliati et al., 1985), в цитоплазме неоплодотворенных ооцитов *Xenopus* большая часть материнских мРНК распределена равномерно, то некоторые мРНК локализованы либо в анимальной, либо в вегетативной области ооцита. Из этих ооцитов была экстрагирована РНК, содержащая (поли)А, и затем для перевода молекул РНК в популяцию двухцепочечных ДНК была использована обратная транскриптаза. Эти двухцепочечные ДНК были встроены в векторы для клонирования и выращены по отдельности в клетках *E. coli*. Таким путем получили около двух миллионов клонов.

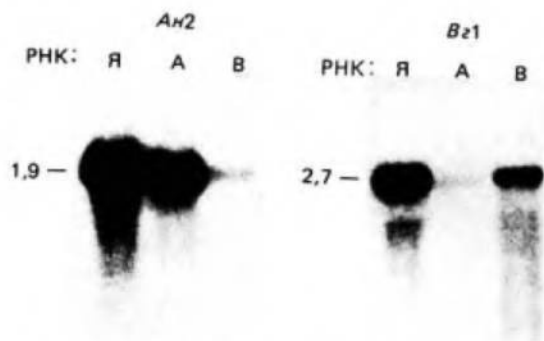


Рис. 14.16. Демонстрация мРНК, локализованной в анимальном и вегетативном полюсах ооцита *Xenopus*. РНК получали из целого яйца (Я), областей анимального (А) и вегетативного (В) полюсов и фракционировали методом электрофореза в геле. РНК переносили с помощью Нозерн-блоттинга на бумажный фильтр, который инкубировали с радиоактивной ДНК клонов, полученных из кДНК, комплементарной мРНК ооцита. Радиоактивная ДНК клон *An2* гибридизуется с мРНК, содержащейся в клетках анимального полюса и не содержащейся в клетках вегетативного полюса. Обратное распределение наблюдается для мРНК, которая гибридизуется с ДНК клон *Bz1*. (*Bz1*-РНК является той самой мРНК, которая упоминалась в гл. 8 как мРНК, кодирующая продукт, подобный фактору роста, играющему, по-видимому, важную роль в детерминации мезодермы.) (Из Reblaghiati et al., 1986; фотография с любезного разрешения D. Melton.)

ДНК из этих клонов (ооцитной библиотеки *Xenopus*) была перенесена на два листа фильтровальной бумаги и денатурирована в условиях, обеспечивающих ее разделение на отдельные нити. Кроме того, исследователи отрезали от ооцита анимальные и вегетативные области и экстрагировали из этих частей содержащую (поли)А РНК. На этих РНК были синтезированы радиоактивные кДНК. Затем одну группу ДНК-содержащих фильтров инкубировали с кДНК для анимальных мРНК, а другую группу – с кДНК для вегетативных мРНК. При измерении связывания радиоактивных кДНК оказалось, что большинство клонов связывали одинаковые количества кДНК из анимальной и вегетативной областей, свидетельствуя о равномерном распределении соответствующих мРНК. Однако около 1,2% клонов связывали только кДНК, полученную на мРНК анимальной области, а около 0,2% клонов связывали только кДНК, полученную на мРНК вегетативной области.

ДНК клонов, специфичных для анимальных или вегетативных мРНК, могли быть затем использованы для идентификации мРНК, локализованных в ооците неравномерно. Для этого РНК экстрагировали из целых яйцеклеток или из их анимальных или вегетативных областей и разгоняли в геле. Электрофоретически разделенные РНК переносили с помощью блоттинга (Нозерн-блоттинг) на нитроцел-

люлозные фильтры и гибридизовали с радиоактивными ДНК-зондами для каждого из клонов, специфичных для определенной области ооцита. Два из полученных результатов показаны на рис. 14.16. Таким образом, неравномерная локализация в цитоплазме преобразованных ооцитных мРНК может наблюдаться и в мозаичных, и в регуляторных яйцах.

Механизм трансляционного контроля ооцитных мРНК

В настоящее время предложено по крайней мере пять гипотез относительно регуляции трансляции ооцитных мРНК. Три из них касаются доступности молекул мРНК, тогда как две другие – эффективности трансляции мРНК. Эти гипотезы могут рассматриваться как конкурирующие друг с другом, однако вполне вероятно, что у большинства видов регуляция трансляции ооцитных мРНК осуществляется с помощью нескольких механизмов.

МАСКИРОВАННЫЕ мРНК. Согласно этой гипотезе, ооцитные мРНК физически замаскированы белками, поэтому мРНК не могут присоединиться к рибосоме. мРНК никогда не обнаруживается свободной от белков. Однако с мРНК могут быть ассоциированы белки различного типа. В 1966 г. Спирин предположил, что мРНК ооцита запасена в **информосомах**, рибонуклеопротеидных комплексах, где мРНК закрыта белками (Spirin, 1966). Эти замаскированные мРНК не способны связываться с рибосомами и поэтому не транслируются. При оплодотворении белки, экранирующие мРНК, отделяются (возможно, из-за изменений ионных условий, происходящих в ходе оплодотворения) и мРНК высвобождается, чтобы инициировать трансляцию.

Вскоре эта гипотеза была подтверждена. В 1968 г. в ооцитах морского ежа были обнаружены рибонуклеопротеидные (РНП) частицы, которые седиментировали медленнее, чем рибосомы (Infante, Nemer, 1968), а несколько позже было обнаружено, что эти частицы содержат разнообразные мРНК (Gross et al., 1973).

Серия экспериментов в лаборатории Рэффа показала, что ооцитная мРНК действительно запасается в такой форме, которая не способна к трансляции и чувствительна к ионным изменениям, происходящим при оплодотворении. Нерибосомные РНП-частицы выделили из зрелых ооцитов морского ежа и выяснили, что они содержат РНК с поли(А)-хвостами (Jenkins et al., 1978). Таким образом, эти РНП-частицы, по-видимому, содержат мРНК. РНП-частицы выделяли в растворах с двумя различными ионными силами (рис. 14.17). Одни частицы были выделены в «ооцитном» буфере, содержащем 0,35 мМ K^+ и 5 мМ Mg^{2+} , т.е. при ионных условиях, соответствующих неоплодотво-

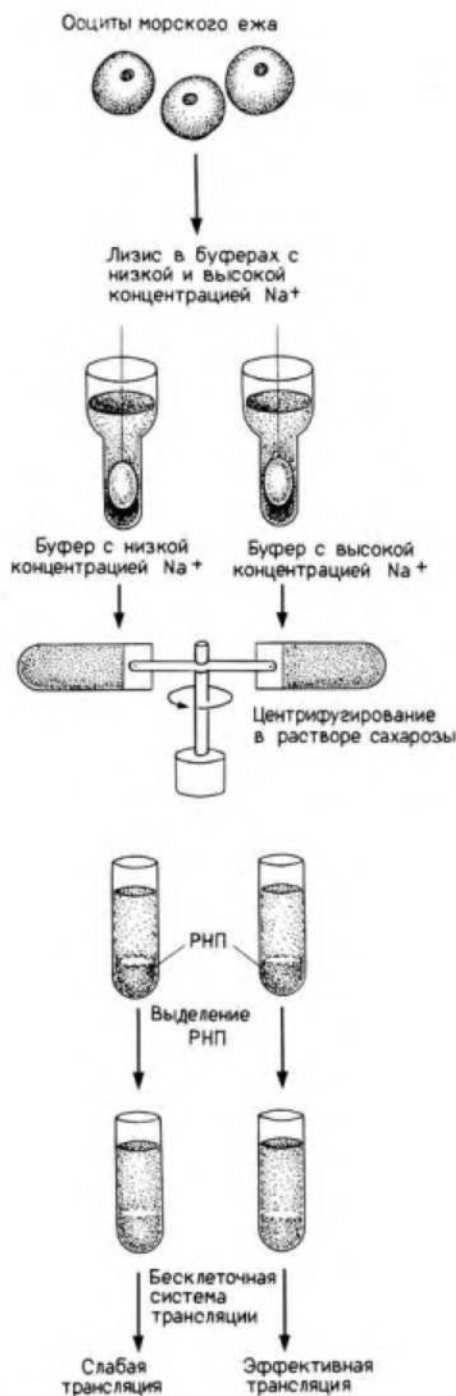


Рис. 14.17. Опыт, демонстрирующий наличие мРНК в РНК-частицах. Связанная с белком РНК не может транслироваться в буфере с низкой ионной силой, но может транслироваться в буфере, содержащем ионы натрия в высокой концентрации; в этих условиях происходит высвобождение мРНК из РНК.

ренному ооциту. Другие частицы выделяли в присутствии $0,35 \text{ mM Na}^+$, т.е. при той концентрации ионов, когда должны удаляться белки, связанные с мРНК нековалентными связями. мРНК-содержащие частицы, полученные в «ооцитном» буфере, транслировались в бесклеточной системе очень плохо. А РНК, экстрагированные в Na-содержащем буфере, была способна поддерживать белковый синтез почти так же хорошо, как мРНК, выделенная из ооцитов. Поэтому полагают, что приток натрия при оплодотворении может дестабилизировать РНК-частицу, благодаря чему ее мРНК сможет транслироваться (Raff, 1980).

Недавно маскирование запасенных мРНК удалось связать с определенными белками, специфичными для ооцитов. Ооциты содержат мРНК-связывающие белки, которые отличаются от аналогичных белков соматических клеток, и некоторые из этих специфических для ооцита мРНК-связывающих белков узнают определенные последовательности (Audet et al., 1987). Эти различия могут иметь важное функциональное значение. Если глобиновую мРНК инъецировать в ооциты *Xenopus*, то она будет эффективно транслироваться. Однако если эту мРНК предварительно смешать с белками, выделенными из РНК-частиц ооцитов шпорецовой лягушки, то наблюдается крайне незначительный уровень трансляции. РНК-связывающие белки, выделенные из других тканей, не влияли на трансляционную способность инъецированных глобиновых мРНК. Следовательно, специфические для ооцита белки РНК-частиц участвуют в трансляционной регуляции запасенных материнских мРНК (Richter, Smith, 1984).

Известно, что в неоплодотворенном ооците морского ежа в составе полисом содержится менее 1% рибосом, тогда как в бластомерах на стадии дробления в полисомы связано уже около 20% рибосом (рис. 14.18). Поскольку в это время новые мРНК не синтезируются, в полисомы, очевидно, вовлекаются предсуществующие мРНК. В трех проведенных сравнительно недавно экспериментах показано, что в полисомы у зародышей включается мРНК из РНК ооцитов. У морского ежа радиоактивно меченная РНК, которая исходно была в составе РНК ооцита, позже становится связанной с полисомами бластомеров (Young, Raff, 1979). Аналогичная закономерность наблюдалась в ходе раннего развития двусторчатых моллюсков. В этом случае при анализе свободной от белков мРНК ооцитов и зародышей в бесклеточных системах трансляции было обнаружено, что обе эти фракции кодируют одинаковые белки (Rosenthal et al., 1980). Другими словами, ооциты и зародыши содержат одинаковые наборы мРНК. Однако в полисомах ооцитов и зародышей все же имеются различаю-

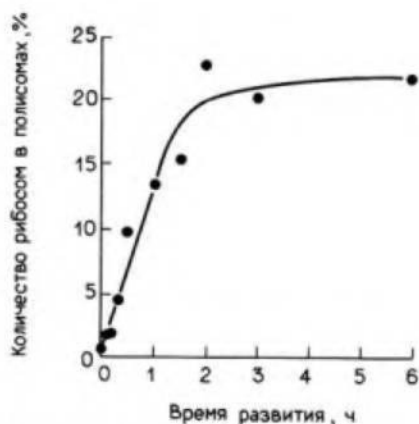


Рис. 14.18. Увеличение относительного количества рибосом, включенных в состав полисомов, в ходе раннего развития морского ежа. (По Humphreys, 1971.)

щиеся фракции мРНК. Молекулы мРНК для трех известных белков, специфичных для зародышей (А, В и С), в цитоплазме ооцита обнаруживаются в составе нетранслируемых РНК, тогда как в бластомерах зародыша они обнаруживаются в полисом-

ной мРНК. Напротив, молекулы мРНК для трех белков, характерных для ооцитов (Х, Y и Z), выявляются в полисомах ооцитов, но не зародышей. Таким образом, можно проследить рекрутирование мРНК из нетранслируемых РНП в транскрипционно активные полисомы.

Рекрутирование мРНК наблюдается также у зародышей *Drosophila*. Из РНП и полисом ооцита, а также полисом зародышей дрозофилы выделили поли(А)-содержащую мРНК, которую затем транслировали в бесклеточной системе, содержащей радиоактивные аминокислоты (Mermod et al., 1980). Было обнаружено, что на мРНК из РНП ооцитов можно синтезировать определенные белки, которые нельзя синтезировать на мРНК из полисом ооцитов (рис. 14.19, А, Б). Однако эти белки можно синтезировать на мРНК, выделенной из полисом зародыша (рис. 14.19, В). Следовательно, мРНК, первоначально запасенная в РНП-частицах ооцита, вовлекается в полисомы зародыша. Таким способом инициация трансляции контролирует экспрессию генов.

мРНК БЕЗ КЭП-ГРУППЫ. Для эффективной трансляции необходимы 5'- и 3'-концы мРНК. Мы уже видели, как различия в длине 3'-поли(А)-хвостов

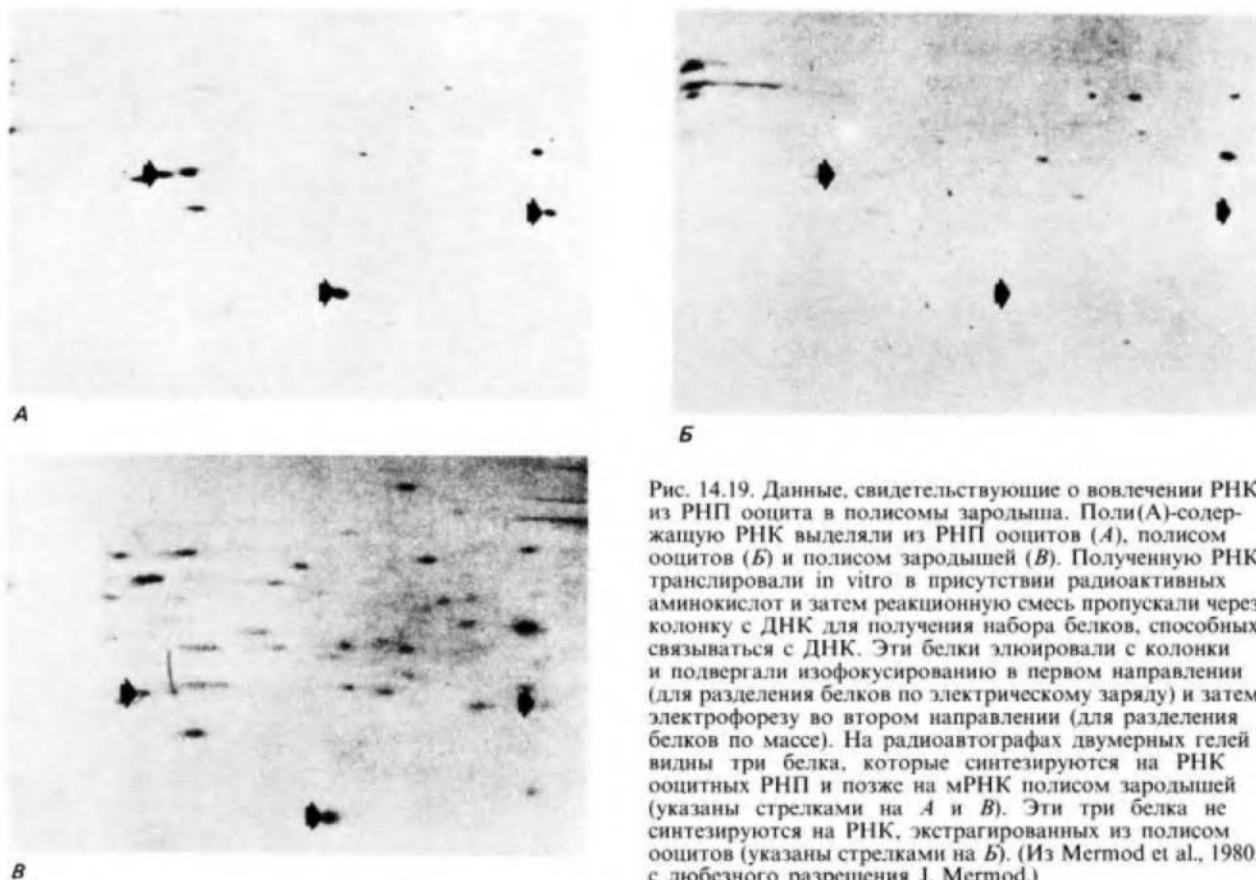


Рис. 14.19. Данные, свидетельствующие о вовлечении РНК из РНП ооцита в полисомы зародыша. Поли(А)-содержащую РНК выделяли из РНП ооцитов (А), полисом ооцитов (Б) и полисом зародышей (В). Полученную РНК транслировали *in vitro* в присутствии радиоактивных аминокислот и затем реакционную смесь пропускали через колонку с ДНК для получения набора белков, способных связываться с ДНК. Эти белки элюировали с колонки и подвергали изофокусированию в первом направлении (для разделения белков по электрическому заряду) и затем электрофорезу во втором направлении (для разделения белков по массе). На радиоавтографах двумерных гелей видны три белка, которые синтезируются на РНК ооцитных РНП и позже на мРНК полисом зародышей (указаны стрелками на А и Б). Эти три белка не синтезируются на РНК, экстрагированных из полисом ооцитов (указаны стрелками на В). (Из Mermod et al., 1980; с любезного разрешения J. Mermod.)

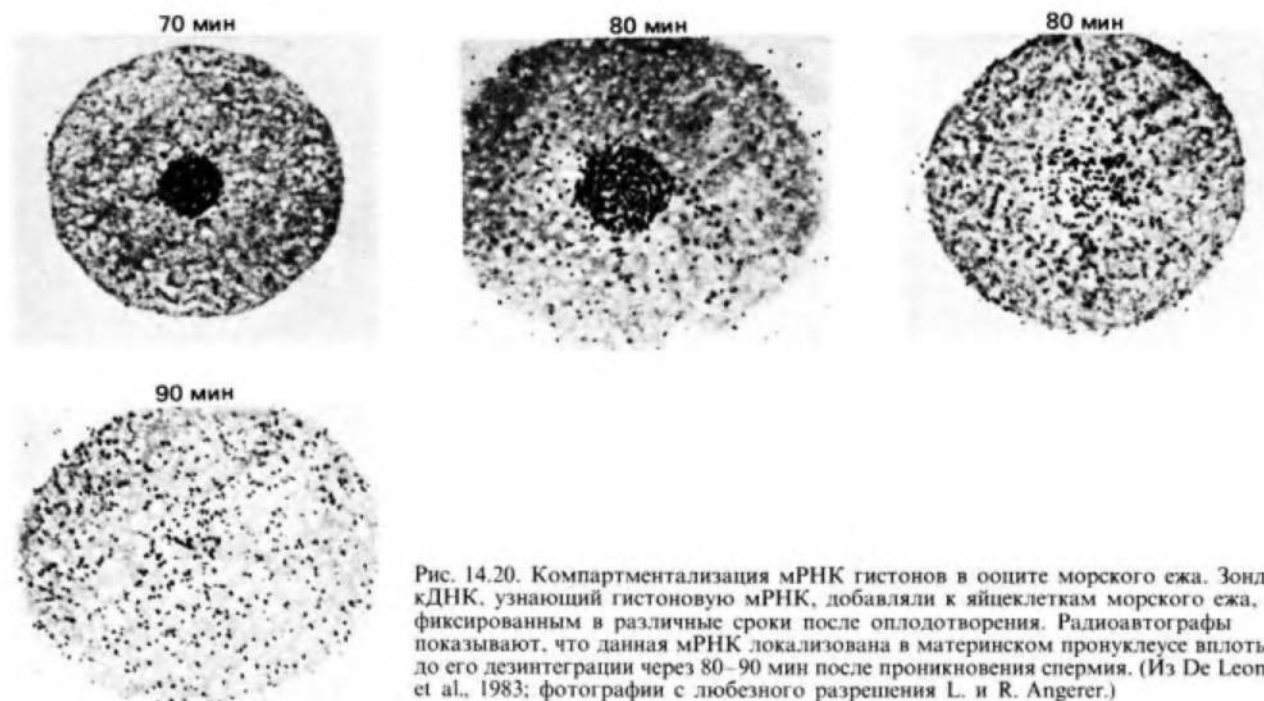


Рис. 14.20. Компартментализация мРНК гистонов в ооците морского ежа. Зонд кДНК, узнающий гистоновую мРНК, добавляли к яйцеклеткам морского ежа, фиксированным в различные сроки после оплодотворения. Радиоавтографы показывают, что данная мРНК локализована в материнском пронуклеусе вплоть до его дезинтеграции через 80–90 мин после проникновения спермия. (Из De Leon et al., 1983; фотографии с любезного разрешения L. и R. Angerer.)

могут влиять на дифференциальную трансляцию РНК в ооцитах *Spisula*. Некоторые бабочки используют для трансляционного контроля механизм, связанный с изменениями 5'-кэп-группы (Kastern et al., 1982). Чтобы эффективно транслироваться, почти все эукариотические мРНК нуждаются в присутствии на своих 5'-концах кэп-группы, содержащей 7-метилгуанозин (Shatkin, 1976). В ооците табачного бражника запасенные мРНК имеют неметилованную кэп-группу, при этом гуанозин содержится, но к нему не добавлена метильная группа. Такие мРНК не транслируются в белки в бесклеточной системе. Однако при оплодотворении в ооцитах бражника проходит волна метилирования и завершается формирование кэп-групп. Молекулы мРНК, обладающие сформированными кэп-группами, способны затем связаться с рибосомами и иницировать трансляцию. В любом случае, замаскирована ли молекула мРНК белками или не завершена модификация ее 5'-конца, инициация трансляции будет подавлена. Эта молекула может не транслироваться до тех пор, пока не поступит соответствующий сигнал.

КОМПАРТМЕНТАЛИЗОВАННЫЕ мРНК. В некоторых работах подвергается сомнению вывод о том, что ооцитные РНП не способны к трансляции. Вместо этого полагают, что белоксинтезирующий аппарат в ооците компартментализован, благодаря чему закрыт доступ мРНК (в составе РНП) к рибосомам (Moon et al., 1982). Синтез гистоновых мРНК в

ооцитах морского ежа регулируется, по-видимому, с помощью разграничения такого типа. Гистоновые мРНК локализованы не в цитоплазме ооцита, а в его большом пронуклеусе. И только по завершении оплодотворения, когда пронуклеус разрушается, гистоновая мРНК выходит в цитоплазму (рис. 14.20) (DeLeon et al., 1983). Этого может не быть в случае других мРНК. В пронуклеусе находится менее 0,1% всей мРНК ооцита (Angerer, Angerer, 1981), а те РНП, которые содержат мРНК для актина и тубулина, локализованы преимущественно в цитоплазме (Showman et al., 1982). Известно, что некоторые материнские мРНК, как и отдельные рибосомы, присоединены к цитоскелету (Moon et al., 1983), следовательно, цитоскелет также может отделить молекулы мРНК от рибосом.

ИЗМЕНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТРАНСЛЯЦИИ. В предложенных ранее моделях трансляционной регуляции предполагается, что транскрипционный аппарат способен эффективно транслировать любую мРНК, но что мРНК и рибосомы физически или химически отделены друг от друга. На самом деле этого не требуется. Исходно низкое значение pH в ооците само по себе может препятствовать синтезу белка. Как обсуждалось в гл. 2, у морского ежа в ходе оплодотворения происходит значительное высвобождение ионов водорода, приводящее к увеличению значения pH в цитоплазме с 6,9 до 7,4. Из неоплодотворенных ооцитов морского ежа группой исследователей была получена бесклеточная систе-

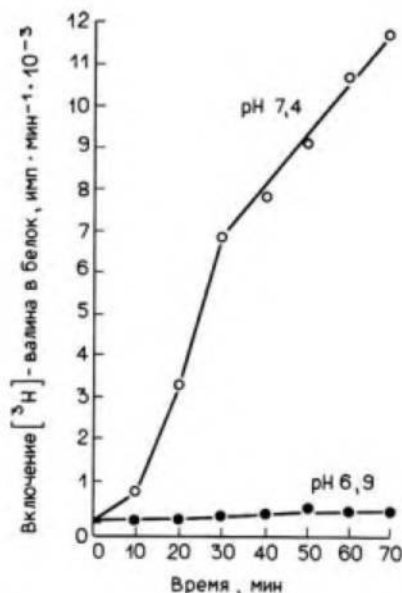


Рис. 14.21. Данные, свидетельствующие о неактивности синтеза белка при значении pH, которое наблюдается в яйцеклетке до оплодотворения. Систему трансляции *in vitro*, полученную из неоплодотворенных яйцеклеток, оставляли при pH 6,9 или диализовали до pH 7,4. Эндогенные мРНК транслируются значительно эффективнее при значении pH, которое устанавливается после оплодотворения. (По Winkler, Steinhardt, 1981.)

ма трансляции *in vitro* (Winkler, Steinhardt, 1981). Значение pH в полученной суспензии либо сохраняли неизменным, либо изменяли с помощью диализа и затем измеряли включение радиоактивного валина в белки. Экзогенную мРНК не добавляли. На рис. 14.21 показаны результаты одного из таких экспериментов. Увеличение значения pH с уровня ооцита (pH 6,9) до уровня зиготы (pH 7,4) вызывало подъем белкового синтеза, напоминающий тот, что происходит при оплодотворении.

Было высказано предположение, что изменение pH активирует трансляционный аппарат яйца (Hille et al., 1985; Danilchik et al., 1986). Рибосомы и факторы инициации, выделенные из ооцитов, были менее активны при трансляции, чем рибосомы, полученные из оплодотворенных яиц. Кроме того, инъекция экзогенной глобиновой мРНК в неоплодотворенные яйцеклетки не увеличивала количества синтезируемого белка. Глобиновая мРНК транслировалась за счет других мРНК, что свидетельствует о наличии какого-то компонента трансляционного аппарата в лимитирующем количестве. Лимитирующим фактором является, вероятно, фактор инициации трансляции. Добавление эФИ-2В (ГТФ-связывающий фактор циклов) или эФИ-4F (кэп-связывающий белок) к лизату, приготовленному из неоплодотворенных яйцеклеток, приводило к увеличению трансля-

ционной эффективности этого лизата (Colin et al., 1987; Loro et al., 1988). Вполне вероятно, что подщелачивание цитоплазмы яйца служит как для демаскирования мРНК, так и для активации факторов инициации. Это положение получило подтверждение в опытах, показавших трехкратное увеличение связывания мРНК с рибосомами после повышения значения pH (Winkler et al., 1985). При этом не наблюдалось присоединения ооцитных мРНК к рибосомам. Следовательно, яйцеклетка морского ежа регулирует трансляцию как путем изменения доступности мРНК, так и путем активации факторов инициации трансляции. Существует много способов регуляции трансляции запасенных в яйцеклетке мРНК, и различные организмы могут использовать несколько таких способов одновременно.

Материнские мРНК и дробление

Дробление у морского ежа требует непрерывного синтеза белка на запасенных материнских мРНК. Если яйца морского ежа оплодотворяются в присутствии ингибитора трансляции, то дробления не происходит, хотя оба пронуклеуса сливаются. Кроме того, не образуется митотического веретена, хромосомы не конденсируются и ядерная мембрана не разрушается (Wagenaar, Mazia, 1978).

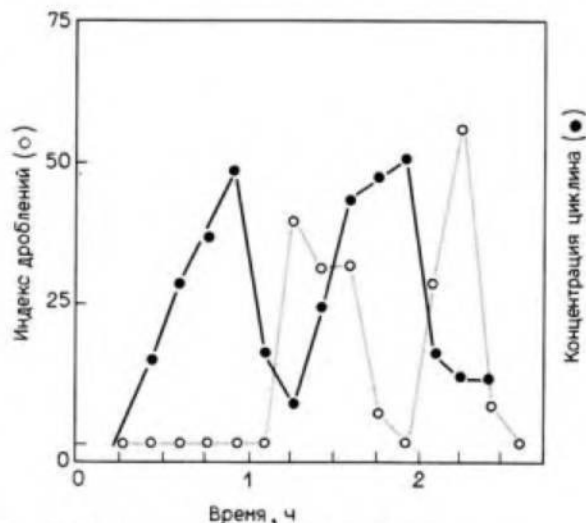


Рис. 14.22. Корреляция делений дробления с концентрацией циклина в зародышах морского ежа. Яйцеклетки оплодотворяли в присутствии радиоактивных аминокислот и через каждые 10 мин определяли относительное количество делящихся клеток и концентрацию специфического белка, который обнаруживает цикличность. Наибольшие концентрации этого белка наблюдали в середине каждого клеточного цикла, затем белок деградировал и синтезировался вновь. Концентрация других белков в данный период увеличивалась линейно (не показано). (По Evans et al., 1983.)

Таким образом, некоторые белки, кодируемые материнскими мРНК, играют, по-видимому, важную роль в делении клеток при дроблении.

Эта гипотеза была подтверждена открытием группы белков, названных **циклинами** (Evans et al., 1983). Циклины кодируются материнскими мРНК и не обнаруживаются в неоплодотворенной яйцеклетке. После оплодотворения их синтез резко возрастает. Особенно замечательно в циклинах то, что они разрушаются при клеточном делении и после завершения каждого деления дробления ресинтезируются заново на запасенных мРНК (рис. 14.22). Синтез циклинов снижается, когда зародыш завер-

шает стадию бластулы. Впервые циклины были обнаружены у морского ежа, позднее — у других видов. Белки А и В у двустворчатого моллюска *Spisula* (о чем упоминалось ранее) представляют собой циклин, и их активность коррелирует с клеточным циклом. После оплодотворения эти белки непрерывно синтезируются на запасенных материнских мРНК и накапливаются в течение S-фазы и ранней М-фазы клеточного цикла. В ходе митоза эти белки разрушаются. Полагают, что циклины могут определять время клеточных делений, так как инъекция циклина А в ооциты *Xenopus* стимулирует их к вхождению в мейоз (Swenson et al., 1986).

Дополнительные сведения и гипотезы

Активация генома зародыша

Скорости развития животных различных видов чрезвычайно сильно варьируют. К 24 часам после оплодотворения личинка дрозофилы уже вылупилась из яйца и интенсивно питается, зародыши амфибий находятся на стадии поздней гаструлы или ранней нейрулы, а зародыши морского ежа — на стадии поздней бластулы или ранней гаструлы, содержащей сотни клеток. Зародыши млекопитающих не торопятся. К 24 часам после оплодотворения зигота мыши разделена всего лишь один раз, а яйцеклетку человека отделяют от первого деления дробления примерно 6 ч. Исходя из такого разнообразия, можно ожидать, что геномы зародышей различных видов активируются в разное время (табл. 14.4). У зародышей *Xenopus* резкая активация наблюдается после двенадцатого деления дробле-

ния (Newport, Kirschner, 1982). До этого времени ядерная транскрипция у нормальных зародышей не обнаруживается, но после перехода к средней бластуле транскрипция начинается с высокой скоростью (рис. 14.23). У морского ежа, по-видимому, ядра зародыша функционируют постоянно. Даже в пронуклеусах перед их слиянием наблюдается транскрипция (в том числе синтез новых гистоновых мРНК), хотя уровень ее очень невысок (Poccia et al., 1985). Эти новосинтезированные мРНК присоединяются к большому фонду материнских мРНК. В ходе первых четырех дроблений хроматин образуется преимущественно из гистонов, запасенных в цитоплазме ооцита, и из гистонов, синтезированных на материнских мРНК. Однако, начиная со стадии 16 клеток большая часть гистонов синтези-

Таблица 14.4. Активация геномов зародышей и продолжительность функционирования материнской мРНК

Организм	Время регистрации первых транскриптов в ядрах	Время основной волны синтеза новых транскриптов в ядрах	Продолжительность функционирования материнских мРНК
Млекопитающие (<i>Mus musculus</i>)	Поздняя фаза одноклеточной стадии (11–17 ч)	Ранняя морула (от 8 до 16 клеток) (3 сут)	Четырехклеточная стадия (2–4 сут)
Амфибии (<i>Xenopus laevis</i>)	12-е деление дробления (4000 клеток) средней бластулы (7 ч) ¹⁾	12-е деление дробления (4000 клеток) средней бластулы (7 ч)	Стадия нейрулы (15–30 ч)
Иглокожие (<i>S. purpuratus</i> и другие морские ежи)	Зигота (стадия пронуклеусов) ($\leq 0,5$ ч)	Средняя бластула (~128 клеток) (11 ч)	Поздняя бластула (15 ч)
Насекомые (<i>Drosophila melanogaster</i>)	Синцитиальная бластодерма после 10-го деления ядер (2,5 ч)	Клеточная бластодерма после 14-го деления ядер (3,5 ч)	Средняя фаза органогенеза (~15 ч)

Источники: Wilt, 1964; Poccia et al., 1985; Weir, Kornberg, 1985; Clegg, Piko, 1983; Gilbert, Solter, 1985; Woodland, Ballentine, 1980; Davidson, 1986; Edgar, Schubiger, 1986.

¹⁾ Время указывает продолжительность инкубации при соответствующей температуре. Крайне низкий уровень синтеза РНК наблюдается у *Xenopus* уже на стадии 6-го деления дробления (64 клетки, 3,5 ч), если бластомеры инкубируются в специальных условиях (Nakakura et al., 1987).

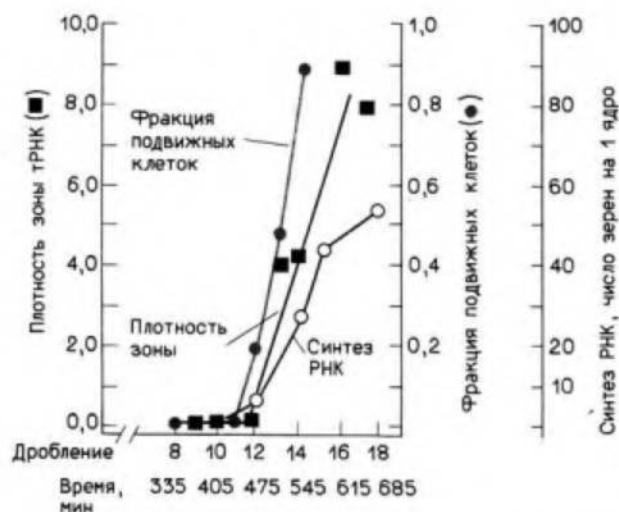


Рис. 14.23. Активация транскрипции и клеточной подвижности после двенадцатого клеточного деления у *Xenopus*. Транскрипцию измеряли с помощью радиоавтографии по числу восстановленных зерен серебра над областью ядер зародышей, инкубированных в присутствии радиоактивного уридина, а также по активации клонированного гена тРНК, радиоактивный продукт которого можно было определить по плотности соответствующей зоны на радиоавтографе геля. Подвижность определяли, подсчитывая фракцию клеток, имеющих ламеллоподии или обнаруживающих лакуны при видеозаписи. (По Davidson, 1986.)

руется на молекулах мРНК, которые были транскрибированы в ядрах клеток зародышей (Goustin, 1981). Эта картина существенно отличается от той, что наблюдается у зародышей *Xenopus*, у которых значительный фонд запасенных в ооците гистонов и большой запас ооцитных гистоновых мРНК используются тысячами клеток.

У дрозофилы транскрипция в ядре наблюдается впервые после его десятого деления. Это первый клеточный цикл с G2-фазой, и длительность G2-фазы увеличивается с 10 мин после 10-го цикла до 60 мин после 14-го цикла. В G2-фазе 14-го цикла

уровень транскрипции генома наибольший в течение всего эмбриогенеза (Anderson, Lengyel, 1979; Weir, Kornberg, 1985). Ядра дрозофилы приобретают компетентность к транскрипции на 10-й цикл, но большинству генов для активации требуется более продолжительная G2-фаза (Edgar, Schubiger, 1986). Высокая транскрипционная активность, свойственная зародышам 14-го цикла, может быть индуцирована ранее с помощью искусственного удлинения G2-периода циклогексимином. Эту активацию можно осуществить в зародышах 10-го цикла, но не в более ранних. Следовательно, большинство генов приобретают способность к активации в течение 10-го цикла, но не инициируют свою транскрипцию вплоть до 14-го цикла.

В отличие от организмов, обсуждавшихся выше, для мышей характерен определенный период, когда используются материнские мРНК, за которым следует период, когда эти мРНК заменяются на ядерные транскрипты. Материнские мРНК существуют около двух суток – примерно такое же время они существуют у представителей других эволюционных групп, – и затем, в течение вторых суток, материнские мРНК быстро разрушаются (Clegg, Piko, 1983). Когда продукты, кодируемые материнскими мРНК, распадаются, они заменяются новыми белками, синтезированными на мРНК, новообразованной в ядре. В большинстве случаев хромосомы, полученные от сперматозоидов, активируются, вероятно, одновременно с хромосомами, полученными от яйца (Gilbert, Solter, 1985).

У всех исследованных видов животных существует период, когда события раннего развития контролируются посредством мРНК и белков, запасенных в цитоплазме ооцита. У большинства видов (млекопитающие составляют исключение) ядерный геном активируется задолго до того, как разрушаются материнские мРНК, поэтому оба набора мРНК транслируются одновременно. В конечном счете, когда на первые или вторые сутки материнские мРНК разрушаются, транскрипты с генома зародыша начинают играть главную роль.

Гормональная стабилизация специфических мРНК

Продукты дифференцированных генов синтезируются нередко в ответ на гормональную индукцию. В некоторых таких случаях гормоны не увеличивают транскрипцию определенных мРНК, а действуют на уровне трансляции. Одним из таких примеров является синтез казеина у млекопитающих. Казеин – главный фосфопротеид молока, и поэтому он представляет собой дифференцированный продукт молочной железы. Как будет обсуждаться

более подробно в гл. 19, молочная железа формируется благодаря последовательному действию ряда гормонов. При этом пролактин является гормоном, ответственным за лактацию, т. е. за реальную продукцию молока. Пролактин увеличивает транскрипцию казеиновых мРНК всего лишь примерно в 2 раза, а главный его эффект – очевидно, стабилизация казеиновых мРНК (Guyette et al., 1979). Пролактин каким-то образом увеличивает продолжительность жизни казеиновой мРНК настолько, что она существует в 25 раз дольше, чем другие мРНК в клетке (рис. 14.24). В результате каждая молекула казеино-

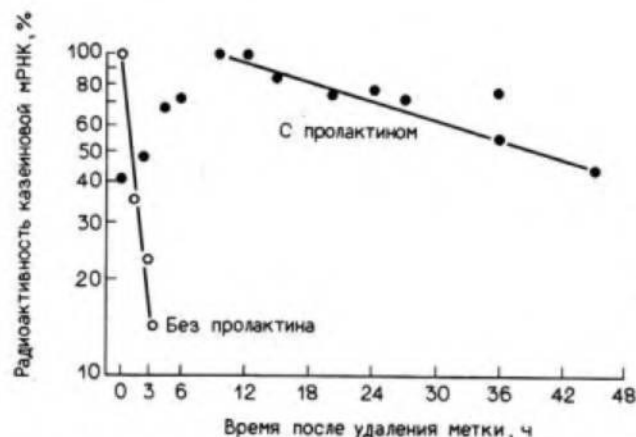


Рис. 14.24. Разрушение мРНК казеина в присутствии пролактина и в его отсутствие. В культуру клеток млекопитающих добавляли радиоактивные предшественники РНК ("pulse"); через определенное время клетки отмывали и инкубировали с нерадиоактивными предшественниками ("chase"). Затем выделяли казеиновую РНК, синтезированную в период мечения, и определяли ее радиоактивность. В отсутствие пролактина новосинтезированная казеиновая мРНК быстро разрушается с временем полужизни, равным 1,1 ч. Когда тот же опыт провели в среде, содержащей пролактин, время полужизни мРНК увеличилось до 28,5 ч. (По Guyette et al., 1979.)

вой мРНК может быть использована для большего числа циклов трансляции. При этом с каждой молекулы мРНК может быть синтезировано больше, чем обычно, молекул белка. В табл. 14.5 представлены данные, которые показывают, что другие гормоны также увеличивают стабильность специфических мРНК.

Широкая распространенность контроля на уровне трансляции

Контроль на уровне трансляции является, вероятно, основным механизмом регуляции развития. Мы убедились в его важной роли при запуске синтеза белка после оплодотворения, при сбалансировании синтезов компонентов гемоглобина и индуцированном гормоном синтезе казеина. Имеется много других случаев трансляционной регуляции, детальный механизм которых еще не известен. Например, глюкоза способна вызывать 10-кратное увеличение синтеза проинсулина в β -клетках поджелудочной железы. Когда для определения содержания инсулиновой мРНК в β -клетках использовали кДНК-зонд, было обнаружено, что стимулированные глюкозой клетки содержат проинсулиновой мРНК не больше, чем нестимулированные клетки (Itoh, Okamoto, 1980). Следовательно, регуляция синтеза инсулина глюкозой осуществляется на уровне трансляции, а не транскрипции. В эритроблестах и культивируемых клетках млекопитающих и птиц обнаруживаются мРНК (называемые **просомами**), которые, подобно информосомам ооцита, ингибируют непосредственную трансляцию связанных с ними мРНК (de Sa et al., 1986; Akhayat et al., 1987). Реактивация высушенных зародышей морской креветки регулируется, по-видимому, также на уровне трансляции. Эти зародыши (продающиеся часто как «морские обезьяны») начинают развитие и затем в течение длительного времени могут пребывать в покое. В покоящихся зародышах белок не синтезируется. Было обнаружено, что в них содержится ингибитор белкового синтеза и что при реактивации уровень функционального эФИ2 увеличивается в 20 раз (Filipowicz et al., 1975). Кроме того, было показано, что этот ингибитор может представлять собой

Таблица 14.5. Стабилизация гормонами специфических мРНК

мРНК	Клетки или ткани	Регуляторный эффектор	Время полужизни, ч	
			+ эффектор	- эффектор
Вителлогенин	Печень <i>Xenopus</i>	Эстроген	500	16
Альбумин	Печень <i>Xenopus</i>	Эстроген	3	10
Вителлогенин	Печень птиц	Эстроген	22	~ 2,5
Апо VLDL II	Печень птиц	Эстроген	26	3
Казеин	Молочная железа крысы	Пролактин	92	5
Гормон роста	Клетки гипофиза крысы в культуре	Дексаметазон и тироксин	20	2
Инсулин	Клетки панкреатического островка крысы	Глюкоза	77	29
Овальбумин	Яйцевод курицы	Эстроген, прогестерон	~ 24	2-5

Источник: Shapiro et al. (1987)

протеинкиназу (Sierra et al., 1977). Таким образом, у зародышей морской креветки может функционировать такой же механизм регуляции, который участвует в регуляции синтеза гемоглобина.

По-видимому, даже спермии контролируют экспрессию определенных генов на уровне трансляции. Как и в яйцеклетках, в спермиях могут запасаться мРНК для последующего использования. Это можно наблюдать в спермиях птиц и млекопитающих для лактатдегидрогеназы-Х (ЛДГ-Х). Этот белок синтезируется только на поздних стадиях развития спермиев, однако ген ЛДГ-Х транскрипционно активен на всех стадиях сперматогенеза (Blanco, 1980). Синтез белка ЛДГ-Х регулируется, вероятно, на стадии инициации трансляции запасенных мРНК.

Один из наиболее неожиданных механизмов трансляционного контроля был обнаружен недавно в случае регуляции синтеза аполипопротеина-В. Белки аро-В являются компонентами сывороточных белков-переносчиков липидов, и, как полагают, они играют главную роль в развитии атеросклероза. Аро-В48 (48 000 дальтон) синтезируется в кишечнике и становится частью хиломикронных комплексов, необходимых для адсорбции и транспорта холестерина и триглицеридов пищи. Аро-В100 (100 000 дальтон) синтезируется в печени и является основным компонентом белков-переносчиков липидов очень низкой, низкой и промежуточной плотности. Белки аро-В100 и аро-В48 транскрибируются с одного и того же гена, причем дифференциального процессинга РНК, который мог бы генерировать различные мРНК для этих двух белков, не наблюдается. Анализ кДНК для аро-В свидетельствует о том, что в печени аро-В мРНК кодирует полный полипептид аро-В100. А соответствующая мРНК из кишечника отличается от мРНК из печени только одним основанием. Произошла замена Ц на У, что привело к замене обычного кодона для глутамина (ЦАА) на кодон-терминатор (УАА) в кодоне 2153. Это различие проявляется в образовании в кишечнике более короткого белка аро-В48 (Powell et al., 1987; Chen et al., 1987). Этот случай, по-видимому, может служить примером, когда в самой мРНК происходит специфическая замена основания. До этого времени аксиомой молекулярной биологии являлось представление, что нуклеотиды в уже синтезированной мРНК не могут быть изменены. Нам неизвестен какой-либо другой пример образования новых белков в результате изменения информации в самой мРНК.

Таким образом, трансляционный контроль является весьма важным и широко используемым механизмом регуляции экспрессии генов в развитии.

ПОСТТРАНСЛЯЦИОННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

Коль скоро белок синтезирован, он встраивается в структуры более высокого уровня организации. Он может стать частью цитоскелета или включиться в один из множества ферментативных путей синтеза и распада клеточных метаболитов. В любом случае индивидуальный белок является теперь частью сложной «экосистемы», которая интегрирует его во взаимоотношения с многочисленными другими белками. Поэтому нам не уйти от проблемы регуляции экспрессии генов и после того, как белок синтезирован, ввиду некоторых изменений, которые могут еще произойти. Во-первых, некоторые новосинтезированные белки не активны без последующих модификаций. Эти модификации могут заключаться в отщеплении определенных ингибиторных доменов белка или в присоединении небольших компонентов для увеличения активности белка. Во-вторых, некоторые белки могут избирательно инактивироваться. Иногда инактивация может осуществляться с помощью присоединения ингибиторного лиганда. В-третьих, некоторые белки должны быть «адресованы» в свои специфические внутриклеточные компартменты. Клетка не просто мешок с ферментами; обычно белки локализуются в определенных областях, таких, как мембраны, лизосомы или митохондрии. В-четвертых, некоторым белкам необходимо объединиться с другими белками, чтобы образовать функциональное целое. Гемоглобин, микротрубочки и рибосомы – все это примеры объединения многочисленных белков, чтобы сформировать функциональный комплекс. Следовательно, на экспрессию генетической информации можно влиять также и на посттрансляционном уровне.

Посттрансляционная активация белков

Многие новосинтезированные полипептиды не активны до тех пор, пока от них не будут удалены определенные аминокислотные остатки. Эта ситуация особенно показательна в случае пептидных гормонов. Например, предшественником инсулина является длинный полипептид с тремя дисульфидными мостиками. Гормон становится активным только после удаления середины и начала пептида. Две оставшиеся части, удерживаемые дисульфидными связями, составляют активную молекулу (рис. 14.25). В случае АКТГ-эндорфина несколько небольших пептидных гормонов синтезируются в виде одного предшественника (рис. 14.26). Этот полипептид может быть расщеплен с образованием адренокортикотропного гормона (АКТГ), γ -липотропина (γ -ЛТГ) и β -эндорфина. Последующий про-

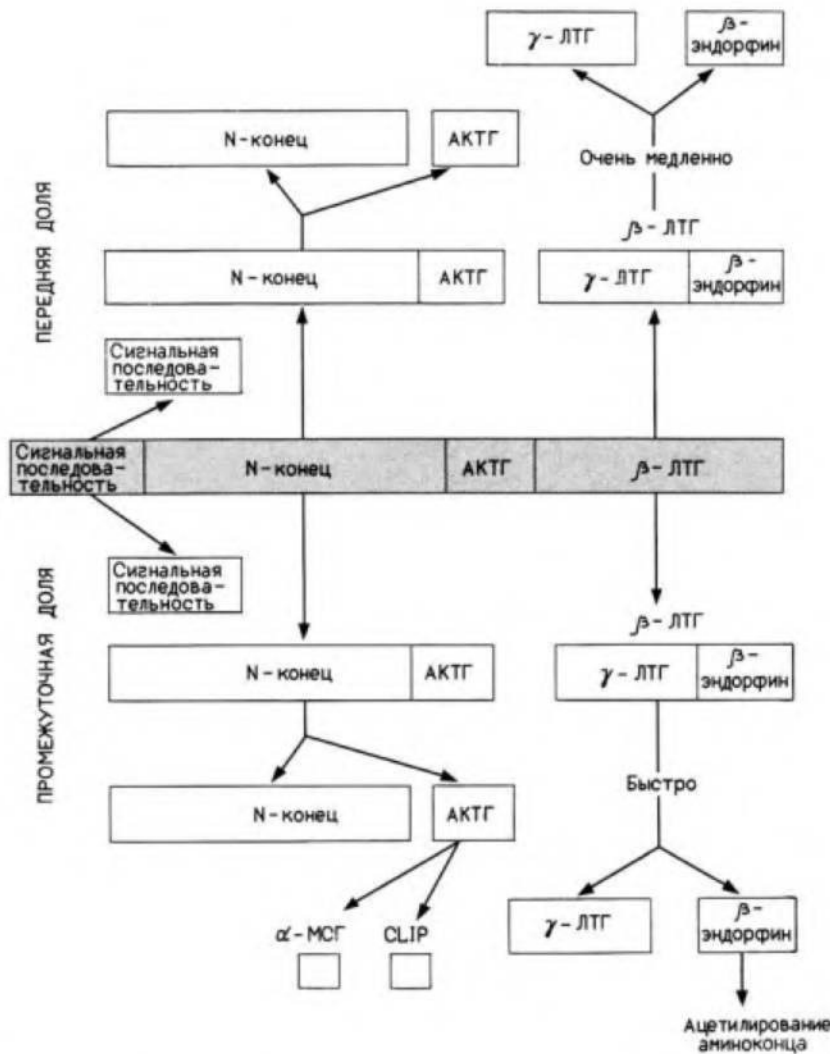


Рис. 14.26. Процессинг про-АКТГ-эндорфина (темная полоса) в промежуточной и передней долях гипофиза крысы. АКТГ – адренокортикотропный гормон; γ -ЛТГ – γ -липотропный гормон; α -МСГ – α -меланоцитстимулирующий гормон. (По Herbert et al., 1981.)

делью для изучения биохимии клеточного цикла. У физарума гистон Н4 может существовать в нескольких формах в зависимости от характера его ацетилирования. Сильноацетилированный (2–4 ацетильных группы) Н4 связан с транскрипционной активностью (Chahal et al., 1980). Напротив, фосфорилирование гистона Н1 проявляется в активации его способности конденсировать хроматин, благодаря чему транскрипция уменьшается. Ацетилирование Н4 и фосфорилирование Н1 у этого миксомицета находятся в обратной зависимости друг от друга. Таким образом, валовая транскрипционная активность хроматина может регулироваться фосфорилированием или ацетилированием гистонов.

Инактивация белков при посттрансляционных модификациях

Изменения предсуществующих белков могут приводить также к их *инактивации*. Ранее в этой главе мы указали, как фосфорилирование инактивирует фактор инициации 2, регулируя тем самым синтез гемоглобина. Сходным образом инактивируются при фосфорилировании гликоген-синтаза и пируваткиназа. Глутамин-синтаза инактивируется, когда на нее переносится остаток АМФ. Поскольку все эти реакции обратимы, каталитическая активность белков может регулироваться исключительно точно с помощью изменения активности ферментов, добавляющих или отщепляющих модифицирующие группы.

В ряде случаев некоторые белки опасно оставлять внутри клетки. Например, необходимо, чтобы быстро разрушались белки, вызывающие переход клеток к делению, если с ростом клеток скоординирован синтез ДНК. Эти быстро разрушающиеся белки (время полужизни которых составляет менее 2 ч) содержат одну или несколько областей, богатых пролином, глутаминовой кислотой, серином и треонином (Rogers et al., 1986). Долгоживущие белки редко имеют такие кластеры, а если и имеют, то они упрятаны глубоко внутри структуры белка. Однако наиболее важным единичным детерминантом времени жизни белка является, по-видимому, его аминоконцевая аминокислота. Бахмайр и др. (Bachmaier et al., 1986) с помощью мутирования клонированного гена для β -галактозидазы изменяли первый кодон (АУГ) на кодоны для пятнадцати других аминокислот. Когда клетки дрожжей были трансформированы этими шестнадцатью плазмидами, несущими ген дикого типа или один из его мутантных аллелей, разница в продолжительности жизни соответствующего белка оказалась огромной (табл. 14.6). И если время полужизни внутри клетки для нормальной β -галактозидазы (с метионином на своем аминоконце) составляет более 20 ч, то в случае других аминоконцевых аминокислот это время порой сокращается до менее 3 мин.

Таблица 14.6. Зависимость стабильности белка от концевой аминокислотного остатка

Остаток X в X- β -галактозидазе	Время полужизни X- β -галактозидазы
Мет } Сер } Ала } Тре } Вал } Гли }	> 20 ч
Иле } Глу }	~ 30 мин
Тир } Гли }	~ 10 мин
Фен } Лей } Асп } Лиз }	~ 3 мин
Арг } Про }	~ 2 мин ~ 7 мин

Источник: Bachmaier et al., 1986.

Корреляция между продолжительностью жизни белка и его аминоконцевой аминокислотой распространяется, очевидно, также и на природные белки. Кроме того, эта корреляция соответствует наблюдениям, что аминоконцы белков претерпевают посттрансляционную модификацию при гибели клеток *in vivo* (Soffer, 1980; Shyne-Athwal et al., 1986). При этом на аминоконцы белков переносятся с аминоконцевых тРНК дестабилизирующие аминокислоты (Арг, Лиз, Лей, Фен и Тир). Предполагается, что определенный фактор присоединяется к другим клеточным белкам, превращая их в мишень для деградации, и что вероятность связывания этого фактора с любым данным белком зависит от его аминоконца (Bachmaier et al., 1986). Связавшись, этот фактор обеспечивает присоединение к данному белку **убиквитина**. Пришивание убиквитина (небольшой пептид, который образует ковалентные связи с остатками лизина белка-мишени) маркирует белок для деградации. На рис. 14.27 показано, что каждая молекула β -галактозидазы, намеченная для деградации, комплексируется с молекулами убиквитина в количестве до 15.

Клетки различаются по белкам, которые они способны разрушать. Один из таких примеров — лактатдегидрогеназа (ЛДГ), которая катализирует обратимое взаимопревращение пирувата и лактата. ЛДГ кодируется двумя различными генами: один ген кодирует субъединицы ЛДГ-А, а другой — ЛДГ-В. Эти гены находятся на разных хромосомах. Функциональный фермент ЛДГ является тетрамером, т.е. он состоит из четырех субъединиц. Эти субъединицы могут быть А- или В-разновидностей. Если экспрессируются оба гена, то ожидается присутствие пяти различных форм ЛДГ: А4, А3В1, А2В2, А1В3 и В4. Альтернативные формы фермента называют **изоферментами**. Эти изоферменты ЛДГ обладают различной каталитической активностью при различных клеточных условиях. Если оба гена ЛДГ экспрессируются одинаково и рекомбинация субъединиц происходит случайно, то можно ожидать появления изоферментов разных типов в следующем отношении 1 (А4):4 (А3В1):6 (А2В2):4 (А1В3):1 (В4). Эти изоферменты имеют различные электрические заряды, так как субъединица В несет больший отрицательный заряд, чем субъединица А. Следовательно, эти пять изоферментов можно разделить при электрофорезе и затем окрасить их на каталитическую активность (рис. 14.28). Когда равные количества субъединиц объединяются искусственно, действительно обнаруживается отношение 1:4:6:4:1. Однако если обратиться к индивидуальным органам, то наблюдаются значительные отклонения от этого соотношения. Мышечная ЛДГ состоит преимущественно из А-субъединиц, тогда как изоферменты в семенниках, сердце и поч-

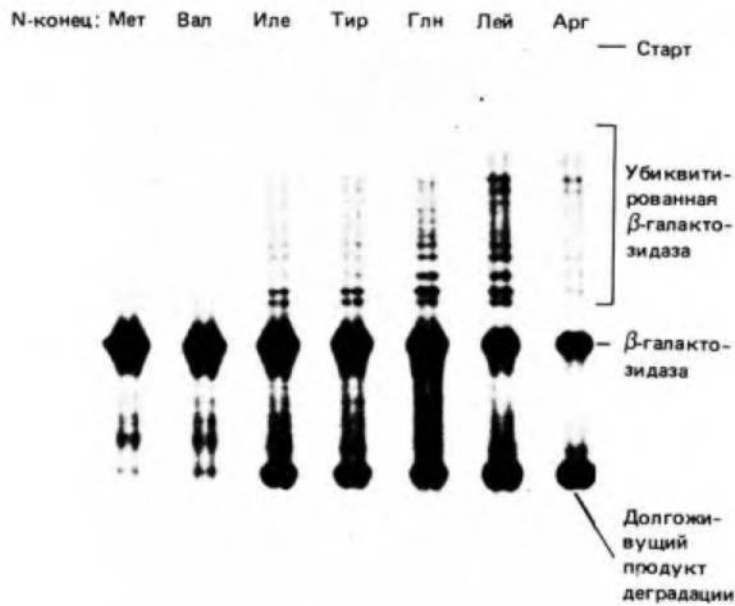


Рис. 14.27. Разрушение β -галактозидазы с различными аминокислотами на аминоконце. Плазмиды, несущие различные гены (каждая плазмида содержала один ген β -галактозидазы, но каждый ген кодировал различные аминоконцы), вводили в клетки дрожжей, которые затем метили радиоактивным метионином в течение 5 мин. Клетки лизировали и ген β -галактозидазы выделяли с помощью иммунопреципитации антителами, полученными к этому ферменту. Белки, узнаваемые антителами (и поэтому выпадающие в осадок), отделяли от антител и неосажденных белков, разделяли в геле и подвергали радиоавтографии. Те полипептиды β -галактозидазы, которые начинались метионином (Мет) или валином (Вал), разрушались в очень незначительной степени. Полипептиды, начинавшиеся изолейцином (Иле), тирозином (Тир) или глутамином (Глн), разрушались достаточно сильно (накопление молекул в нижней части геля), присоединяя наряду с этим несколько пептидов убиквитина (набор полос в верхней части геля свидетельствует об утяжелении интактного белка). β -Галактозидазы, начинающиеся лейцином (Лей) или аргинином (Арг), разрушались в еще большей степени. (Из Bachmair et al., 1986; фотография с любезного разрешения А. Bachmair.)

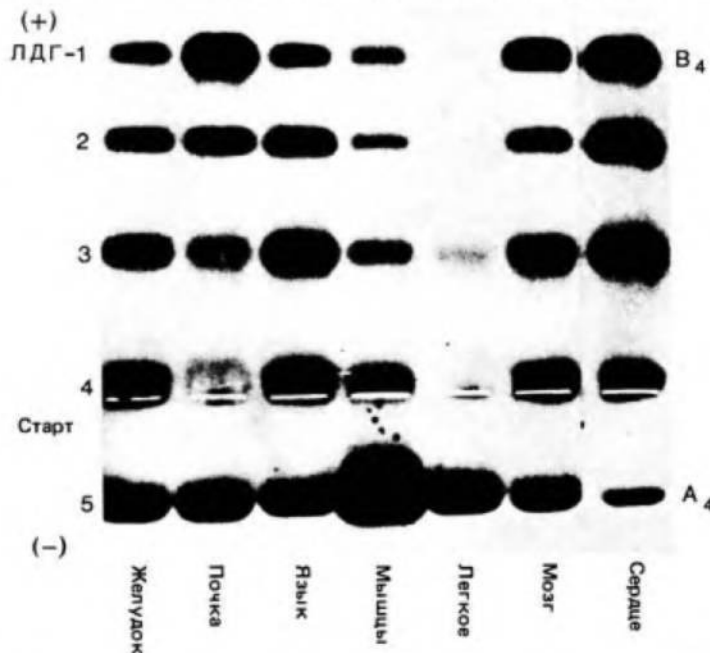


Рис. 14.28. Гель-электрофорез, показывающий различное содержание пяти изоферментов лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в разных тканях крысы. (Из Markert, Ursprung, 1971.)

ках составлены в основном из В-субъединиц (Marger, 1968).

Используя антитела к ЛДГ для осаждения ново-синтезированных А-субъединиц, группа исследователей (Fritz et al., 1969) показала, что скорость синтеза ЛДГ-А существенно не варьирует в разных тканях. Однако скорость ее разрушения варьирует очень сильно. ЛДГ-А сердечной мышцы разрушается в 22 раза быстрее, чем в скелетной мышце. Поэтому контроль изоферментов ЛДГ осуществляется не на уровнях транскрипции или трансляции, а на уровне разрушения фермента.

Субклеточная компартиментализация белков с помощью посттрансляционных модификаций: адресование белков в мембраны и лизосомы

После того как белки синтезированы, они должны быть правильно размещены в клетке. В конечном итоге белок может быть локализован в растворимой цитоплазме, митохондриях, лизосомах, эндоплазматическом ретикулуме или ядре; он может быть даже выделен клеткой.

Белки, которые предназначены для лизосом, эндоплазматического ретикулума или секреции, проходят в полость гранулярного эндоплазматического ретикулума в то время, когда они еще транслируются

(рис. 14.29). Эти белки (включая коллаген и пептидные гормоны, обсуждавшиеся ранее) имеют **сигнальную последовательность**, состоящую примерно из 30 аминокислот, которая узнается **сигнальным рецепторным комплексом**, плавающим в цитоплазме. Когда этот комплекс (который содержит шесть различных пептидных цепей и небольшую молекулу РНК) связывается с пептидом, растущим на цитоплазматической рибосоме, трансляция останавливается. Затем этот комплекс присоединяется к **якорному белку** на эндоплазматическом ретикулуме, и трансляция возобновляется. Растущие полипептиды проходят через мембрану ретикулума, и, когда они оказываются внутри полости, сигнальная последовательность удаляется, а остающийся белок может быть модифицирован (Blobel, Dobberstein, 1975; Walter, Blobel, 1983; Weidmann et al., 1987). Если белок (или предшественник белка) содержит гидрофобную область, то он, возможно, станет частью эндоплазматического ретикулума, а позже – клеточной мембраны. Одна из нерешенных проблем в этой области касается того, как белки локализуются в конкретных участках клеточной мембраны. Так, в плазматических мембранах клеток многих типов определенные белки находятся только на одной стороне мембраны. Мы наблюдали подобное явление при поляризации бластомеров млекопитающих перед компактизацией. Недавно полученные данные (Mostov, 1987) свидетельствуют о том, что существуют определен-

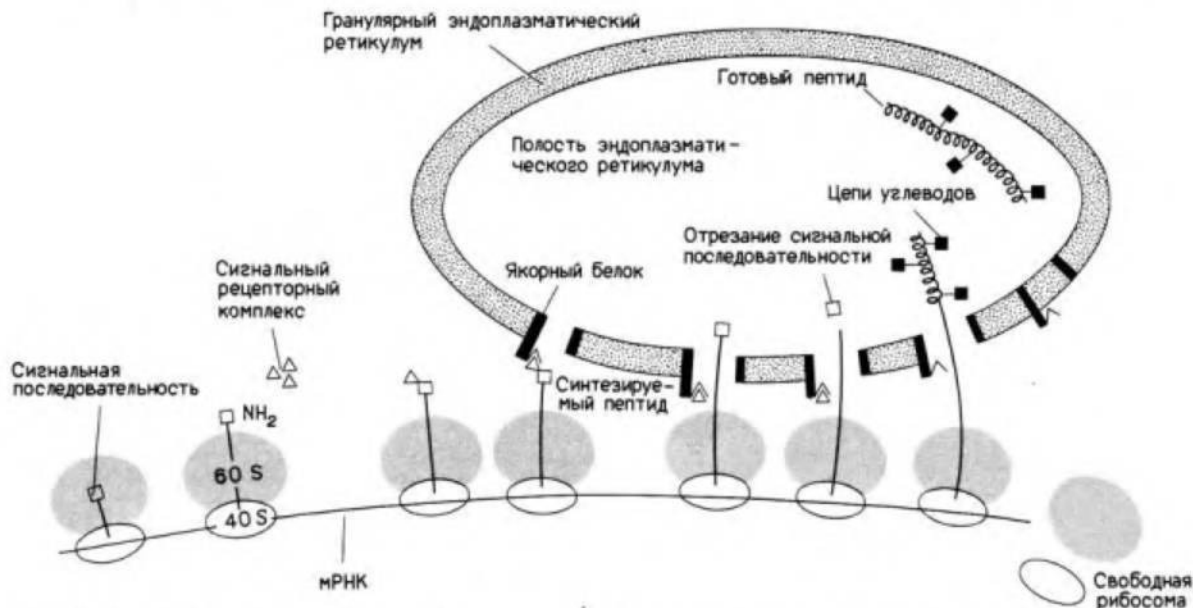


Рис. 14.29. Модели трансляции и гликозилирования секретируемых белков. Первые примерно 50 аминокислот полипептида обычно кодируют «сигнальную последовательность», которая указывает, что данный белок предназначен для встраивания в мембраны гранулярного эндоплазматического ретикулума (ГЭР). Эта последовательность узнается сигнальным рецепторным комплексом и затем сайтами на ГЭР. Когда она оказывается внутри полости, часть этой последовательности отрезается. При дальнейшей элонгации белка к нему добавляются углеводы.

ные последовательности аминокислот, которые специфичны для апикального и базального участков клеточной мембраны.

Одной из таких модификаций является ковалентное присоединение к белку маннозо-6-фосфата. Этот сахар играет роль адресной метки, по которой собираются гликопротеиды для лизосом. Маннозо-6-фосфат узнается рецепторами в определенных областях эндоплазматического ретикулула, благодаря чему там концентрируются ферменты, имеющие эту адресную метку. Затем эта область ретикулула отпочковывается и образует лизосому (Sly et al., 1981). Если модификация не происходит, то эти белки выделяются из клетки. Доказательством этого служит летальный генетический синдром, I-клеточная болезнь, при которой у больных нарушена способность присоединять к белкам адресную метку из маннозо-6-фосфата. У этих больных в лизосомах отсутствуют соответствующие ферменты, которые ошибочно выделяются в кровь.

Для некоторых белков имеются специфичные связывающие полипептиды, которые локализуют эти белки в определенных областях клетки. В печени мыши β -глюкуронидаза находится и в лизосомах, и на эндоплазматическом ретикуле. Метка маннозо-6-фосфата может направить этот фермент в лизосомы, однако в печени β -глюкуронидаза может быть присоединена к эндоплазматическому ретикулулу с помощью белка *игазина* (Swank, Paigen, 1973), который специфически узнает этот фермент. На эндоплазматическом ретикуле клеток печени у мутантной мыши, лишенной *игазина*, β -глюкуронидаза не обнаруживается (Lusis et al., 1976). Локализация β -глюкуронидазы в клетках разных типов обычно различается. Такие ткани, как печень и почки, богаты *игазином* и имеют β -глюкуронидазу на эндоплазматическом ретикуле. Напротив, клетки мозга и селезенки, по-видимому, полностью лишены *игазина* и содержат всю β -глюкуронидазу в лизосомах (Lusis, Paigen, 1977). Таким образом, внутриклеточная локализация белков регулируется посттрансляционно и может быть различна в разных тканях.

Адресование белков в ядра и митохондрии

Накопление конкретного белка в ядре включает в себя *избирательное проникновение* этого белка в ядро и *избирательное удержание* тех белков, которые вошли в ядро (Dingwall et al., 1982; Kalderon et al., 1984). Эти свойства определяются, очевидно, специфическими аминокислотными последовательностями в белке. В 1984 г. в ядерном белке была идентифицирована последовательность из семи аминокислот, которая могла изменить локализацию

исходно цитоплазматического белка (Kalderon et al., 1984). Этим ядерным белком был Т-антиген вируса SV40. Известно, что при мутации в гене этого белка, приводящей к замене лизина в положении 128 на другие аминокислоты, данный белок остается в цитоплазме. Такое наблюдение свидетельствовало о том, что аминокислотная последовательность вокруг положения 128 является сигналом для ядерной локализации. Эту гипотезу проверили в прямом эксперименте, сконструировав рекомбинантную плазмиду, которая объединила почти весь ген для цитоплазматического фермента пируваткиназы и последовательность из 75 пар оснований, кодирующую аминокислоты 114–138 в Т-антигене вируса SV40.

Рекомбинантные плазмиды с помощью микроинъекций вводили в клетки культуры ткани. В некоторых случаях гибридный ген включался в хромосомы, транскрибировался и транслировался в белок, который состоял из пируваткиназы, присоединенной к 25 аминокислотам Т-антигена. При окраске этих клеток флуоресцирующими антителами к пируваткиназе этот белок обнаруживался в ядре (рис. 14.30, А). Уменьшение размеров последовательности из гена для Т-антигена позволило получить разные белки. Рис. 14.30 показывает, что за способность локализоваться в ядре отвечает последовательность с выраженными основными свойствами, состоящая из семи аминокислот: Про–Лиз–Лиз–Лиз–Арг–Лиз–Вал.

Это не означает, что каждый ядерный белок использует данную конкретную последовательность для своей локализации или что каждое ядро узнает этот аминокислотный сигнал. Разные ядерные белки имеют различные сигналы для узнавания ядер (Hall et al., 1984; Davey et al., 1985).

Адресование белка в митохондрии еще более усложнено, так как в самой митохондрии имеется четыре отдельных компартмента. Белок может быть направлен на внешнюю или внутреннюю митохондриальную мембрану, в пространство между мембранами или во внутримитохондриальный матрикс (рис. 14.31). В отличие от адресных последовательностей, направляющих белки в ядро, большинство митохондриальных белков направляются аминокислотными последовательностями, которые могут быть легко отделены от зрелого белка (аналогично сигнальным последовательностям для локализации белков в эндоплазматическом ретикуле). Идентификация этих адресных последовательностей была осуществлена с помощью методик, сходных с теми, которые использовали для обнаружения ядерных сигнальных последовательностей (van Loon et al., 1986; Hurt, van Loon, 1986). Основным внутриклеточным адресным сигналом для митохондриальной локализации является относительно короткая

		Локализация																			
		124									135										
А	Мет Асп Лиз Вал Фен Арг Асн Сер Сер Арг Тре Про Про Лиз Лиз Лиз Арг Лиз Вал Глу Асп Про Арг Асн Сер ---	Я																			
		126									135										
Б	Мет Асп Лиз Ала Глу Фен Лей Глу Ала Про Лиз Лиз Лиз Арг Лиз Вал Глу Асп Про Арг Асн Сер ---	Я																			
		128									135										
В	Мет Асп Лиз Вал Фен Гли Иле Про Арг Гли Лиз Лиз Арг Лиз Вал Глу Асп Про Арг Асн Сер ---	Я																			
		129									135										
Г	Мет Асп Лиз Вал Фен Арг Асн Сер Сер Арг Лиз Арг Лиз Вал Глу Асп Про Арг Асн Сер ---	Я/Ц																			
		130									135										
Д	Мет Асп Лиз Вал Фен Арг Асн Сер Сер Арг Арг Лиз Вал Глу Асп Про Арг Асн Сер ---	Ц																			
		132									135										
Е	Мет Асп Лиз Ала Глу Фен Лей Глу Глу Вал Глу Асп Про Арг Асн Сер ---	Ц																			
		126									133										
Ж	Мет Асп Лиз Ала Глу Фен Лей Глу Ала Про Лиз Лиз Лиз Арг Лиз Вал Глу Фен Арг ---	Я																			
		126									132										
З	Мет Асп Лиз Ала Глу Фен Лей Глу Ала Про Лиз Лиз Лиз Арг Лиз Вал Гли Иле Про ---	Я																			
		126									130										
И	Мет Асп Лиз Ала Глу Фен Лей Глу Ала Про Лиз Лиз Лиз Арг Про Глу Фен Арг ---	Ц																			

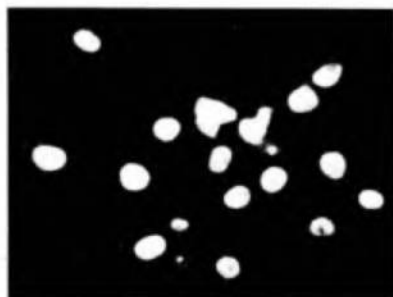


Рис. 14.30. Идентификация аминокислотной последовательности, которая направляет белок в ядро. 25 аминокислотных остатков, фланкирующих лизин-128 в Т-антигене вируса SV40 (А), адресуют в ядро пируваткиназу. Выделенный на рисунке участок показывает ближайшие аминокислотные остатки. Б–И. Вариации в выделенной последовательности позволяют идентифицировать остатки, необходимые для накопления белка в ядрах. Фотографии показывают внутриклеточную локализацию для случаев З и И. (Из Kalderon et al., 1984.)

последовательность, состоящая из периодически расположенных основных аминокислот (конкретные длины и состав аминокислотных последовательностей у митохондриальных белков варьируют). Если эта последовательность находится в белке, то он не только направляется в митохондрии, но будет транслоцирован через обе мембраны в митохондриальный матрикс. Если между зрелым белком и адресующей в матрикс последовательностью лежит гидрофобный участок, то предполагается, что он блокирует перенос белка в матрикс. Это приведет к тому, что данный белок станет частью внутренней мембраны. Если зрелый белок легко отщепляется от этого гидрофобного участка, то он будет обнаруживаться в межмембранном пространстве (van Loon, Schatz, 1987).

Надмолекулярная сборка

Последняя форма посттрансляционной регуляции, которую мы рассмотрим, связана со сборкой новосинтезированных белков в функциональный комплекс. Мы уже рассмотрели ряд белков, которые могут спонтанно собираться в функциональные комплексы. Например, гемоглобин и лактатдегидрогеназа состоят из четырех полипептидных цепей, которые образуют с помощью нековалентных связей функциональный белок. Пример на несколько более высоком уровне – два сократительных белка, тубулин и актин, – существуют в полимерных и непolyмерных формах. Мы видели, что полимеризация актина из глобулярных мономеров в микрофила-

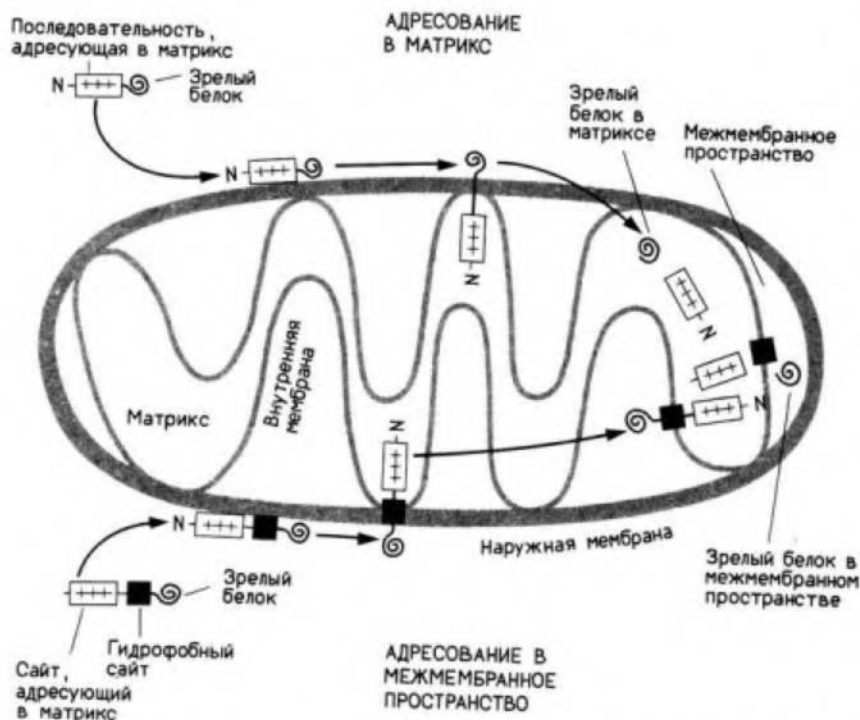


Рис. 14.31. Модель адресования белков в специфические области внутри митохондрии. Все митохондриальные белки, кодируемые ядерными генами, содержат сигнальную последовательность, направляющую в матрикс (изображена прямоугольником с положительными зарядами). Если транспорт белка следует прервать до достижения матрикса, то второй (гидрофобный) сигнал (изображен в виде черного квадрата) позволяет белку задержаться в мембране. Останется ли он в мембране или войдет в межмембранное пространство, зависит от того, будет ли белок отщеплен от этой сигнальной последовательности. Предполагается, что вход предшественников происходит в участках, где две мембраны сближаются друг с другом (Schleyer, Neupert, 1985). Модель составлена по работам Hurt, van Loon (1986), van Loon, Schatz (1987).

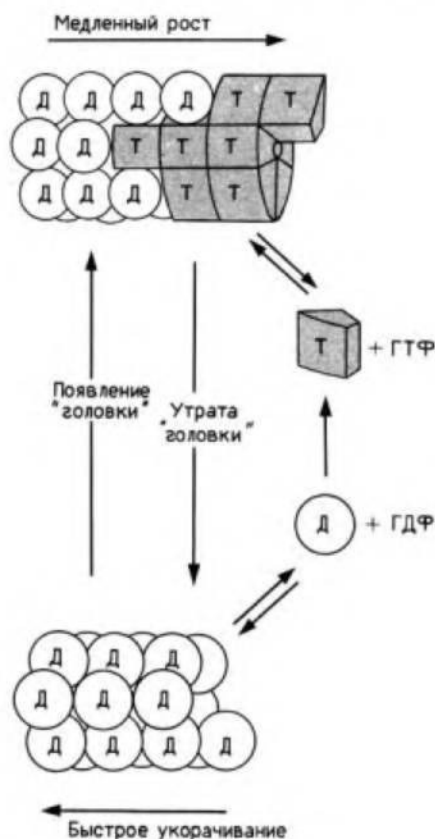


Рис. 14.32. Модель роста и деполимеризации микротрубочек. К растущим микротрубочкам добавляются ГТФ-содержащие субъединицы тубулина (обозначены буквой Т), которые плотно ассоциируют с другими субъединицами тубулина. По мере старения субъединиц связанный с тубулином ГТФ гидролизуется до ГДФ. Тубулин, содержащий ГДФ (обозначен буквой Д), относительно быстро отделяется от микротрубочек. Если гидролиз превосходит сборку, то «головка» из ГТФ-тубулина исчезает и микротрубочка быстро укорачивается. (По Kirschner, Mitchison, 1986.)

менты необходима для развития акросомного процесса при оплодотворении. Сходным образом тубулин собирается в микротрубочки митотического аппарата и распадается на мономеры при завершении митоза. Затем эти тубулиновые единицы могут быть реорганизованы в новые микротрубочки, которые важны для детерминации формы клеток.

Рост микротрубочки регулируется гидролизом молекул ГТФ, которые ковалентно связаны с тубулином. Новополимеризованный тубулин присоединяется к ГТФ и образует стабильные комплексы

с другими молекулами тубулина. При старении тубулинов (или при реорганизации клетки) ГТФ гидролизуются с образованием ГДФ. Тубулин, связанный с ГДФ, не образует комплекс с соседними молекулами тубулина. Полагают, что эта пониженная стабильность вызывает деполимеризацию микротрубочки (рис. 14.32). Как мы увидим в следующей главе, дифференциальный рост микротрубочек может оказывать определяющее влияние на клеточный и эмбриональный морфогенез.

Способность формировать волокна свойственна

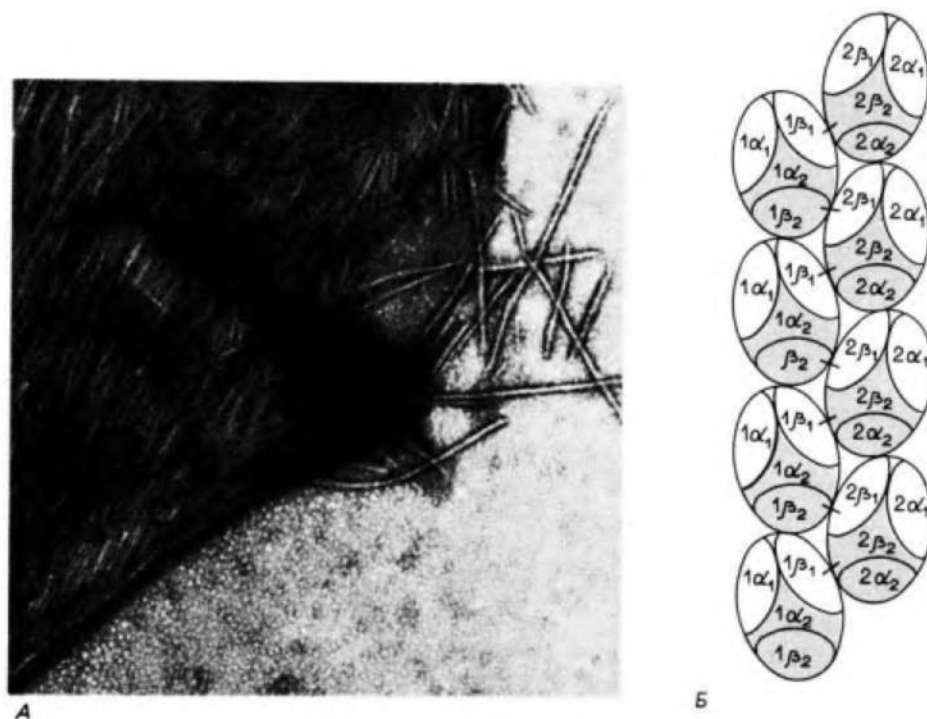


Рис. 14.33. Образование волокон гемоглобина при серповидноклеточной анемии. А. Электронная микрофотография волокон дезоксигенированного аномального гемоглобина, выходящих из эритроцита, разрушенного осмотическим шоком. Б. Модель формирования волокон, согласно которой мутантный β -глобин способен присоединяться к β -глобиновому пептиду другого гемоглобинового тетрамера. (А – из Wellems, Josephs, 1979; фотография с любезного разрешения авторов. Б – по Dickerson, Geis, 1983.)

относительно небольшому набору клеточных белков. Приобретение этой способности другими белками благодаря мутации может приводить к губительным последствиям. Такое явление наблюдается при серповидноклеточной анемии. Замена одной аминокислоты (глутамин на валин в шестом положении β -цепи глобина) вызывает образование гидрофобного кармана, который позволяет взаимодействовать гемоглобиновым тетрамерам в восстановленной форме. Такие волокна растягивают клетку, придавая ей характерную форму серпа, и уменьшают ее гибкость (рис. 14.33).

Некоторые белки образуют комплексы с нуклеиновыми кислотами. Например, гистоны нужны только для того, чтобы вместе с ДНК формировать нуклеосомные частицы. Эукариотическая 80S-рибосома состоит приблизительно из 70 белков и 4 различных рибосомных РНК. Эти белки и нуклеиновые кислоты для своего функционирования должны собираться вместе, и что примечательно, эта сборка происходит быстро и эффективно внутри всех клеток. После этого не должен вызывать удивление тот факт, что полноценные инфекционные вирусы могут быть получены при совместной инкубации структурных белков и нуклеиновых кислот. Белки, которые

«маскируют» мРНК в ооцитах, также являются примерами белков, которые могут формировать специфические комплексы с нуклеиновыми кислотами. Белок ТРПА, который комплексируется с 5S-рРНК в гене 5S-рРНК *Xenopus*, связывается также с 5S-рРНК в ооците и образует стабильную 7S-частицу (Pelham, Brown, 1980). Таким образом, спонтанная самосборка является еще одной важной формой посттрансляционного контроля.

Коллаген: конспект посттрансляционной регуляции

При рассмотрении синтеза коллагена, одного из главных структурных белков тела, мы можем показать важность и разнообразие механизмов посттрансляционного контроля (см. обзоры Prosser et al., 1979; Davidson, Berg, 1981).

Во-первых, последовательность мРНК коллагена транслируется в пептид проколлагена. Аминоконец проколлагена содержит сигнальную последовательность, которая позволяет ему войти в полость гранулярного эндоплазматического ретикула. Этот сигнальный пептид отщепляется от остальной части молекулы коллагена. Внутри эндоплазмати-

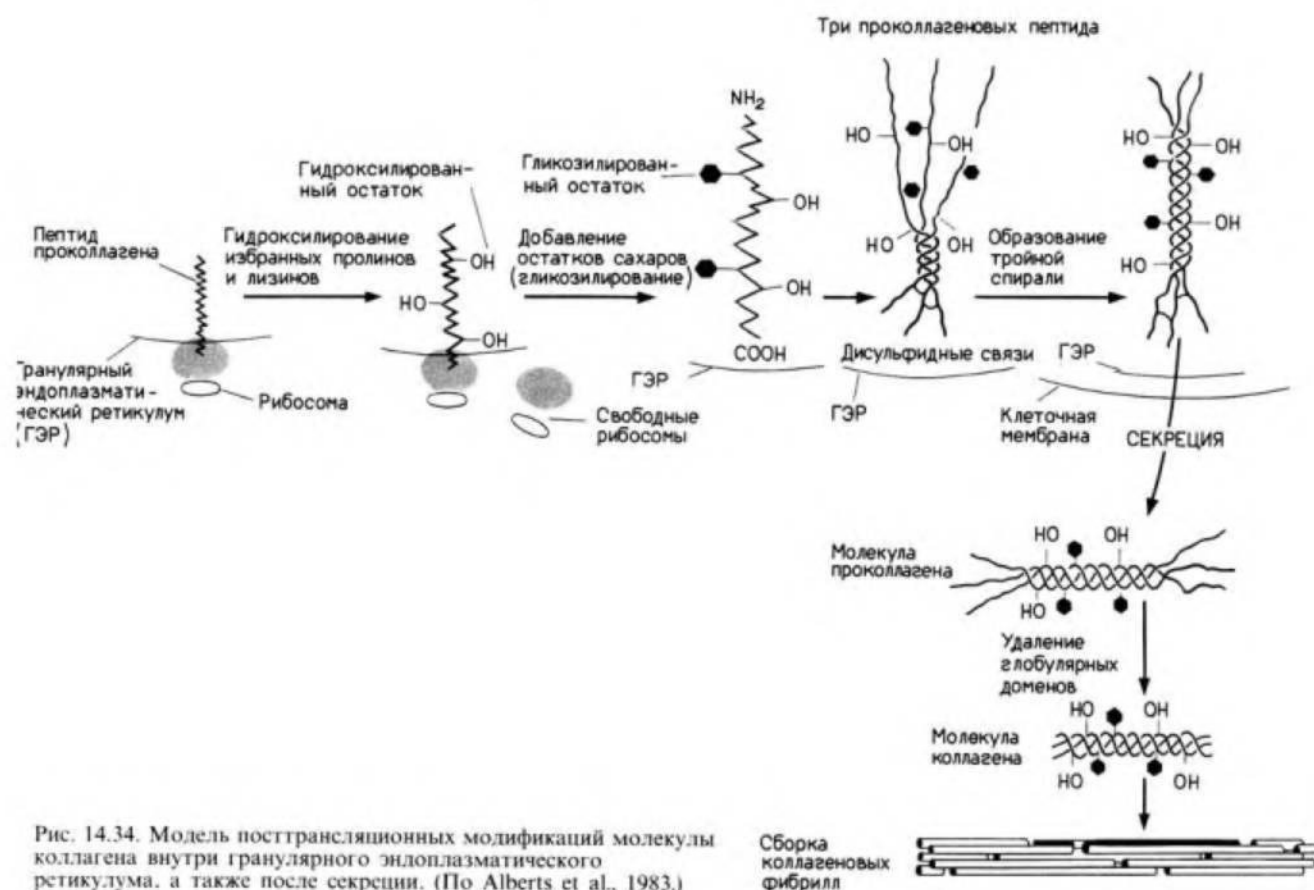


Рис. 14.34. Модель посттрансляционных модификаций молекулы коллагена внутри гранулярного эндоплазматического ретикулума, а также после секрети. (По Alberts et al., 1983.)

ческого ретикулума молекулы коллагена встречаются также с тремя ферментами, которые его гидроксилируют. Два из этих ферментов гидроксилируют остатки пролина в 3-гидроксипролин и 4-гидроксипролин; третий — превращает лизины в оксидилизованные остатки. Эти ферменты узнают остатки пролина и лизина только в определенных положениях (рис. 14.34).

Когда цепи коллагена становятся гидроксилированными, к оксидилизам могут быть добавлены остатки сахаров. Первый фермент — галактозилтрансфераза — добавляет к оксидилизину галактозу; второй фермент — глюкозилтрансфераза — добавляет к оксидилизгалактозе глюкозу. Участок около карбоксильного конца модифицируется глюкозаминном и маннозой.

Следующий этап включает образование внутрицепочечных дисульфидных связей и организацию трех коллагеновых полипептидов в тройную спираль. Дисульфидные связи образуются на карбоксильных концах между прилежащими молекулами коллагена, создавая тем самым условия для формирования тройной спирали. Если пролины были гидроксилированы правильно, то три цепи скручивают-

ся одна вокруг другой, образуя протяженный участок тройной спирали, ограниченный с обеих сторон глобулярными областями.

В таком виде молекула коллагена выделяется во внеклеточное пространство. Процессинг продолжается даже там. Сначала протеолитические ферменты удаляют глобулярные домены на аминоконце и карбоксильном конце. В результате этого отрезания образуется фрагмент совершенной тройной спирали. На следующем этапе эти фрагменты самопроизвольно собираются в фибриллы. Однако эти фибриллы не обладают достаточной механической прочностью, чтобы функционировать в качестве структурных белков до тех пор, пока различные тройные спирали не будут ковалентно связаны друг с другом с помощью дополнительных поперечных швов. Это связывание осуществляется путем ферментативной модификации лизилов в оксидилизованных остатках и присоединения их друг к другу. Таким образом, существует значительное число необходимых этапов модификации белка после трансляции (как мы увидим в следующих двух главах, коллаген — не только исключительно важный структурный белок, но, как полагают, он ответствен

также за некоторые эмбриональные взаимодействия).

Итак, мы рассмотрели различные уровни регуляции экспрессии гена: транскрипцию, процессинг РНК, трансляцию и посттрансляционную модификацию. Было показано, что каждый тип регуляции важен для контроля экспрессии генов в ходе развития. Мы приближаемся к раскрытию тайны дифференцировки, и новые методы клонирования генов (как предсказывал Бовери в 1904 г.) позволяют понять дифференцировку на химическом уровне. Однако проблема дифференцировки индивидуальных клеток не единственная в биологии развития. Нам нужно понять также, как взаимодействуют друг с другом клетки тела, чтобы обеспечить развитие в надлежащее время и в надлежащем месте. В следующей части книги мы рассмотрим клеточные взаимодействия в развитии, приводящие к формированию тканей и органов.

ЛИТЕРАТУРА

- Adamson S. D., Yau P. M. P., Herbert E., Zucker W. V. (1972). Involvement of hemin, a stimulatory fraction from ribosomes, and a protein synthesis inhibitor in the regulation of hemoglobin synthesis. *J. Mol. Biol.* **63**, 247–264.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts L., Watson J. D. (1983). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, New York.
- Akhayat O., de Sa F. G., Infante A. A. (1987). Sea urchin prosome: Characterization and changes during development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 1595–1599.
- Anderson K. W., Lengyel J. A. (1979). Rates of synthesis of major classes of RNA in *Drosophila* embryos. *Dev. Biol.* **70**, 217–231.
- Angerer L. M., Angerer R. C. (1981). Detection of poly A⁺ RNA in sea urchin eggs and embryos by quantitative *in situ* hybridization. *Nucleic Acids Res.* **9**, 2819–2840.
- Audet R. G., Goodchild J., Richter J. D. (1987). Eukaryotic initiation factor 4A stimulates translation in microinjected *Xenopus* oocytes. *Dev. Biol.* **121**, 58–68.
- Bachmair A., Finley D., Varshausky A. (1986). In vivo half-life of a protein is a function of its aminoterminal residue. *Science* **234**, 179–186.
- Blanco A. (1980). On the functional significance of LDH-X. *Johns Hopkins Med. J.* **146**, 231–235.
- Brachet J., Decroly M., Ficq A., Quertier J. (1963). Ribonucleic acid metabolism in fertilized and unfertilized sea urchin eggs. *Biochim. Biophys. Acta* **72**, 660–662.
- Briggs R., Cassens G. (1966). Accumulation in the oocyte nucleus of a gene product essential for embryonic development beyond gastrulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **55**, 1103–1109.
- Brothers A. J. (1979). A specific case of genetic control of early development: The *o* maternal effect mutation of the Mexican axolotl. In: S. Subtelny and I. R. Konigsberg (eds.), *Determinants of Spatial Organization*. Academic Press, New York, pp. 167–184.
- Carroll C. R. (1974). Comparative study of the early embryonic cytology and nucleic acid synthesis of *Ambystoma mexicanum* normal and *o* mutant embryos. *J. Exp. Zool.* **187**, 409–422.
- Chahal S. S., Matthews H. R., Bradbury E. M. (1980). Acetylation of histone H4 and its role in chromatin structure and function. *Nature* **287**, 76–79.
- Chan S. J., Noyes B. E., Agarwal K. L., Steinner D. F. (1979). Construction and selection of recombinant plasmids containing full-length complementary DNAs corresponding to rat insulins I and II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 5036–5040.
- Chen S.-H. and 12 others. (1987). Apolipoprotein B48 is the product of a messenger RNA with an organspecific in-frame stop codon. *Science* **238**, 363–366.
- Clegg K. B., Piko L. (1983). Poly(A) length, cytoplasmic adenylation, and synthesis of poly(A)⁺ RNA in early mouse embryos. *Dev. Biol.* **95**, 331–341.
- Clemens M. J., Henshaw E. C., Rahaminoff H., London I. M. (1974). Met-tRNA_{met} binding to 40 S ribosomal units: A site for the regulation of initiation of protein synthesis by hemin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**, 2946–2950.
- Colin A. M., Brown B. D., Dholakia J. N., Woodley C. L., Wahba A. J., Hille M. B. (1987). Evidence for simultaneous derepression of messenger RNA and the guanine nucleotide exchange factor in fertilized sea urchin eggs. *Dev. Biol.* **123**, 354–363.
- Craig S. P., Piatigorsky J. (1971). Protein synthesis and development in the absence of cytoplasmic RNA synthesis in non-nucleate egg fragments and embryos of sea urchins: Effect of ethidium bromide. *Dev. Biol.* **24**, 213–232.
- Danilchik M. V., Yablonska-Reuveniz Z., Moon R. T., Reed S. K., Hille M. B. (1986). Separate ribosomal pools in sea urchin embryos: Ammonia activates a movement between pools. *Biochemistry* **25**, 3696–3702.
- Davey J., Dimmock N. J., Colman A. (1985). Identification of the sequence responsible for the nuclear accumulation of the influenza virus nucleoprotein in *Xenopus* oocytes. *Cell* **40**, 667–675.
- Davidson E. H. (1986). *Gene Activity in Early Development*, 3rd Ed. Academic Press, New York, pp. 69–173.
- Davidson J. M., Berg R. H. (1981). Posttranslational events in collagen biosynthesis. In: A. R. Hand and C. Oliver (eds.), *Methods in Cell Biology*, Vol. 23. Academic Press, New York, pp. 119–136.
- DeLeon C. V., Cox K. H., Angerer L. M., Angerer R. C. (1983). Most early variant histone mRNA is contained in the pronucleus of sea urchin eggs. *Dev. Biol.* **100**, 197–206.
- Denny P. C., Tyler A. (1964). Activation of protein synthesis in non-nucleate fragments of sea urchin eggs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **145**, 245–249.
- de Sa C. M., de Sa M.-F. G., Akhayat O., Broders F., Scherrer K., Horsch A., Schmid H.-P. (1986). Prosomes: Ubiquity and intraspecies structural variation. *J. Mol. Biol.* **187**, 479–493.
- Dickerson R. E., Geis I. (1983). *Hemoglobin*. Benjamin/Cummings, Menlo Park, CA.
- Dingwall C., Sharnick S. V., Laskey R. A. (1982). A polypeptide domain that specifies migration of nucleoplasm into the nucleus. *Cell* **30**, 449–458.
- Driesch H. (1898). Über rein-mütterliche Charaktere und Bastardlarven von Echiniden. *Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org.* **7**, 65–102.
- Dworkin M. B., Dworkin-Rastl E. (1985). Changes in the RNA titers and polyadenylation during oogenesis and oocyte maturation in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* **112**, 451–457.
- Ecker R. E., Smith L. D. (1971). The nature and fate of *Rana pipiens* proteins synthesized during maturation and early cleavage. *Dev. Biol.* **24**, 559–576.
- Edgar B. A., Schubiger G. (1986). Parameters controlling transcriptional activation during early *Drosophila* development. *Cell* **44**, 871–877.
- Evans T., Rosenthal E., Youngblom J., Distel D., Hunt T. (1983). Cyclin: A protein specified by maternal mRNA in sea urchin

- eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* **33**, 389–396.
- Fagard R., London I. M. (1981). Relationship between phosphorylation and activity of heme-regulated eukaryotic initiation factor 2 kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 866–870.
- Filipowicz W., Sierra J. J., Ochoa S. (1975). Polypeptide chain initiation in eukaryotes: Initiation factor MP in *Artemia salina* embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 3947–3951.
- Francke C., Edstrom J. E., McDowell A. W., Miller O. L. (1982). Microscopic visualization of a discrete class of giant translation units in salivary gland cells of *Chironomus tentans*. *EMBO J.* **1**, 59–62.
- Fritz P. I., Vesell E., White E. L., Pruitt K. M. (1969). Roles of synthesis and degradation in determining tissue concentration of LDH-5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **62**, 558–565.
- Galau G., Kelin W. H., Davis M. M., Wold B., Britten R. J., Davidson E. H. (1976). Structural gene sets active in embryos and adult tissues of the sea urchin. *Cell* **7**, 487–505.
- Gilbert S. F., Solter D. (1985). Onset of paternal and maternal Gpi-2 expression preimplantation mouse embryos. *Dev. Biol.* **109**, 515–517.
- Goustin A. S., Wilt F. H. (1981). Protein synthesis, polyribosomes, and peptide elongation in early development of *Strongylocentrotus purpuratus*. *Dev. Biol.* **82**, 32–40.
- Grace M., Bagchi M., Ahmad F., Yeager T., Olson C., Chakravarty I., Nasron N., Banerjee A., Gupta N. K. (1984). Protein synthesis in rabbit reticulocytes: Characteristics of the protein factor RF that reverses inhibition of protein synthesis in heme-deficient reticulocyte lysates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 6517–6521.
- Gribble T. J., Schwartz H. C. (1965). Effect of protoporphyrin on hemoglobin synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* **103**, 333–338.
- Gross K. W., Jacobs-Lorena M., Baglioni G., Gross P. R. (1973). Cell-free translation of maternal messenger RNA from sea urchin eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 2614–2618.
- Gross M., Redman R., Kaplansky D. A. (1985). Evidence that the primary effects of phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 (α) in rabbit reticulocyte lysate is inhibition of the release of eukaryotic initiation factor 2-GDP from 60S ribosomal subunits. *J. Biol. Chem.* **260**, 9491–9500.
- Gross P. R., Cousineau G. H. (1964). Macromolecular synthesis and the influence of actinomycin D on early development. *Exp. Cell Res.* **33**, 368–395.
- Guyette W. A., Matusik R. J., Rosen J. M. (1979). Prolactin-mediated transcriptional and post-transcriptional control of casein gene expression. *Cell* **17**, 1013–1023.
- Hall M. N., Hereford L., Herskowitz I. (1984). Targeting of *E. coli* β -galactosidase to the nucleus in yeast. *Cell* **36**, 1057–1065.
- Harris H. (1975). Principles of Human Biochemical Genetics. Elsevier North-Holland, New York.
- Hartl F.-U., Schmidt B., Wachter E., Neupert W. (1986). Transport into mitochondria and intramitochondrial sorting of the Fe/S protein of ubiquinol-cytochrome *c* reductase. *Cell* **47**, 939–951.
- Harvey E. B. (1940). A comparison of the development of nucleate and non-nucleate eggs of *Arbacia punctulata*. *Biol. Bull.* **79**, 166–187.
- Herbert E., Phillips M., Budarf M. (1981). Glycosylation steps involved in processing of pro-corticotropin-endorphin in mouse pituitary tumor cells. *Methods Cell Biol.* **23**, 101–118.
- Hershey J. W. B. (1980). The translational machinery: Components and mechanism. In: D. M. Prescott and L. Goldstein (eds.), *Cell Biology: A Comprehensive Treatise*. Academic, New York, pp. 1–68.
- Hille M. B., Danilchik M. V., Colin A. M., Moon R. T. (1985). Translational control in echinoid eggs and early embryos. In: R. H. Sawyer and R. M. Showman (eds.), *The Cellular and Molecular Biology of Invertebrate Development*. University of South Carolina Press, pp. 91–124.
- Hough-Evans B. R., Wold B. J., Ernst S. G., Britten R. J., Davidson E. H. (1977). Appearance and persistence of maternal RNA sequences in sea urchin development. *Dev. Biol.* **260**, 258–277.
- Humphreys T. (1971). Measurements of messenger RNA entering polysomes upon fertilization in sea urchins. *Dev. Biol.* **26**, 201–208.
- Hurt E. C., van Loon A. P. G. M. (1986). How proteins find mitochondria and intramitochondrial compartments. *Trends Biochem. Sci.* **11**, 204–207.
- Infante A., Nemer M. (1968). Heterogeneous RNP particles in the cytoplasm of sea urchin embryos. *J. Mol. Biol.* **32**, 543–565.
- Itoh N., Okamoto H. (1980). Translational control of proinsulin synthesis by glucose. *Nature* **283**, 100–102.
- Jacobson A., Favreau M. (1983). Possible involvement of poly(A) in protein synthesis. *Nucleic Acids Res.* **11**, 6353–6368.
- Jenkins N. A., Kaumeyer J. R., Young E. M., Raff R. A. (1978). A test masked message: The template activity of messenger ribonucleoprotein particles isolated from sea urchin eggs. *Dev. Biol.* **63**, 279–298.
- Kabat D., Chappell M. R. (1977). Competition between globin messenger ribonucleic acids for a discriminating initiation factor. *J. Biol. Chem.* **252**, 2684–2690.
- Kalderon D., Roberts B. L., Richardson W. D., Smith A. W. (1984). A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* **39**, 499–509.
- Karibian D., London I. M. (1965). Control of heme synthesis by feedback inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **18**, 243–249.
- Kastern W. H., Swindlehurst M., Aaron C., Hooper J., Berry S. J. (1982). Control of mRNA translation in oocytes and developing embryos of giant moths. I. Functions of the 5' terminal "cap" in the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Dev. Biol.* **89**, 437–449.
- Kirschner M., Mitchison T. (1986). Beyond self-assembly: From microtubules to morphogenesis. *Cell* **45**, 329–342.
- Kozak M. (1986). Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* **44**, 283–292.
- Levin D., Ranu R., Ernst V., London I. M. (1976). Regulation of protein synthesis in reticulocyte lysates: Phosphorylation of methionyl-tRNA_i binding factor by protein kinase activity of translational inhibitor isolated from heme-deficient lysates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 3112–3116.
- Littauer V. Z., Soreq H. (1982). The regulatory function of poly(A) and adjacent 3' sequences in translated RNA. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **27**, 53–83.
- Lodish H. F. (1971). Alpha and beta globin messenger ribonucleic acid. Different amounts and rates of translation. *J. Biol. Chem.* **246**, 7131–7138.
- London I. M., Clemens M. J., Ranu R. S., Levin D. H., Cherbas L. F., Ernst V. (1976). The role of hemin in the regulation of protein synthesis in erythroid cells. *Fed. Proc.* **35**, 2218–2222.
- Lopo A. C., MacMillan S., Hershey J. W. B. (1988). Translational control in early sea urchin embryogenesis: Initiation factor eIF4F stimulates protein synthesis in lysates from unfertilized eggs of *S. purpuratus*. *Biochemistry* **27**, 351–357.
- Lusis A. J., Tomina S., Paigen K. (1976). Isolation, characterization, and radioimmunoassay of murine egasyn, a protein stabilizing glucuronidase membrane binding. *J. Biol. Chem.* **251**, 7753–7760.
- Lusis A. J., Paigen K. (1977). Relationship between levels of

- membrane-bound glucuronidase and the associated protein egasyn in mouse tissues. *J. Cell Biol.* **731**, 728–735.
- Malacinski G. M. (1971). Genetic control of qualitative changes in protein synthesis during early amphibian (Mexican axolotl) embryogenesis. *Dev. Biol.* **26**, 442–451.
- Markert C. L. (1968). The molecular basis for isozymes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **151**, 14–40.
- Markert C. L., Ursprung H. (1971). *Developmental Genetics*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- Meijlink F., Curran T., Miller A. D., Verma I. M. (1985). Removal of a 67-base pair sequence in the non-coding region of protooncogene *fos* converts it to a transforming gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 4987–4991.
- Mermod J. J., Schatz G., Croppa M. (1980). Specific control of messenger translation in *Drosophila* oocytes and embryos. *Dev. Biol.* **75**, 177–186.
- Moon R. T., Danilchik M. V., Hille M. (1982). An assessment to the masked messenger hypothesis: Sea urchin egg messenger ribonucleoprotein complexes are efficient templates for in vitro protein synthesis. *Dev. Biol.* **93**, 389–403.
- Moon R. T., Nicosia R. F., Olsen C., Hille M. B., Jeffery W. R. (1983). The cytoskeletal framework of sea urchin eggs and embryos: Developmental changes in the association of messenger RNA. *Dev. Biol.* **95**, 447–458.
- Morle F., Lopez B., Henni T., Godet J. (1985). α -Thalassemia associated with the deletion of two nucleotides at positions -2 and -3 preceding the AUG codon. *EMBO J.* **4**, 1245–1250.
- Mostov K. E., Breitfeld P., Harris J. M. (1987). An anchor-minus form of polymeric immunoglobulin receptor is secreted predominantly apically in Madin-Darby canine kidney cells. *J. Cell Biol.* **105**, 2031–2036.
- Nakakura N., Miura T., Yamana K., Ito A., Shiohara K. (1987). Synthesis of heterogeneous mRNA-like RNA and low-molecular-weight RNA before the midblastula transition in embryos of *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* **123**, 421–429.
- Newport J., Kirshner M. (1982). A major developmental transition in early *Xenopus* embryos. II. Control of the onset of transcription. *Cell* **30**, 687–696.
- Palatnik C. M., Wilkins C., Jacobson A. (1984). Translational control during early *Dictyostelium* development: Possible involvement of poly(A) sequences. *Cell* **36**, 1017–1025.
- Pavlakos G. N., Lockard R. E., Vamvakopoulos N., Rieser L., RajBhandary U. L., Vournakis J. N. (1980). Secondary structure of mouse and rabbit α - and β -globin mRNAs: Differential accessibility of initiator AUG codons towards nucleases. *Cell* **19**, 91–102.
- Pelham H. R. B., Brown D. D. (1980). A specific transcription factor that can bind either the 5 S RNA gene or 5 S RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 4170–4174.
- Pelletier J., Sonenberg N. (1985). Insertional mutagenesis to increase secondary structure within the 5' noncoding region of a eukaryotic mRNA reduces translational efficiency. *Cell* **40**, 515–526.
- Poccia D., Wolff R., Kragh S., Williamson P. (1985). RNA synthesis in male pronuclei of the sea urchin. *Biochim. Biophys. Acta* **824**, 349–356.
- Powell L. M., Wallis S. C., Pease R. J., Edwards Y. H., Knott T. J., Scott J. (1987). A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine. *Cell* **50**, 831–840.
- Prockop D. J., Kivirikko K. I., Tuderman L., Guzman N. A. (1979). The biosynthesis of collagen and its disorders. *N. Engl. J. Med.* **301**, 13–23.
- Raff R. A. (1980). Masked messenger RNA and the regulation of protein synthesis in eggs and embryos. In: D. M. Prescott and L. Goldstein (eds.), *Cell Biology: A Comprehensive Treatise*, Vol. 4. Academic, New York, pp. 10–136.
- Raff R. A., Colot H. V., Solvig S. E., Gross P. R. (1972). Oogenetic origin of messenger RNA for embryonic synthesis of microtubule proteins. *Nature* **235**, 211–214.
- Ranu R. S., Levin D. H., Delaunay J., Ernst U., London I. M. (1976). Regulation of protein synthesis in rabbit reticulocyte lysates: Characteristics of inhibition of protein synthesis by a translational inhibitor from heme-deficient lysates and its relationship to the initiation factor which binds Met-tRNA_i. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 2720–2726.
- Ray B. K. and 8 others. (1983). Role of mRNA competition in regulating translation: Further characterization of mRNA discriminatory initiation factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 663–667.
- Raychaudhuri P., Chaudhuri A., Maitra U. (1985). Formation and release of eukaryotic initiation factor 2 GDP complex during eukaryotic ribosomal polypeptide chain initiation complex formation. *J. Biol. Chem.* **260**, 2140–2145.
- Rebagliati M. R., Weeks D. L., Harvey R. P., Melton D. A. (1985). Identification and cloning of localized maternal RNAs from *Xenopus* eggs. *Cell* **42**, 769–777.
- Restifo L. L., Guild G. M. (1986). Poly(A) shortening of coregulated transcripts in *Drosophila*. *Dev. Biol.* **115**, 507–510.
- Richter J. D., Smith L. D. (1984). Reversible inhibition of translation by *Xenopus* oocyte-specific proteins. *Nature* **309**, 378–380.
- Rodgers W. H., Gross P. R. (1978). Inhomogeneous distribution of egg RNA sequences in the early embryo. *Cell* **14**, 279–288.
- Rogers S., Wells R., Rechsteiner M. (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: The PEST hypothesis. *Science* **234**, 364–368.
- Rosenthal E. T., Ruderman J. V. (1987). Widespread change in the translation and adenylation of maternal messenger RNA following fertilization of *Spisula* oocytes. *Dev. Biol.* **121**, 237–246.
- Rosenthal E., Hunt T., Ruderman J. V. (1980). Selective translation of mRNA controls the pattern of protein synthesis during early development of the surf clam, *Spisula solidissima*. *Cell* **20**, 487–494.
- Sarker G., Edery I., Gallo R., Sonenberg N. (1984). Preferential stimulation of rabbit α -globin mRNA translation by a cap-binding protein complex. *Biochim. Biophys. Acta* **783**, 122–129.
- Schleyer M., Neupert W. (1985). Transport of proteins into mitochondria: Translocational intermediates spanning contact sites between outer and inner membranes. *Cell* **43**, 339–350.
- Shapiro D. J., Blume J. E., Nielsen D. A. (1987). Regulation of messenger RNA stability in eukaryotic cells. *BioEssays* **6**, 221–226.
- Shatkin A. J. (1976). Capping of eukaryotic mRNAs. *Cell* **9**, 645–653.
- Shatkin A. J. (1985). mRNA cap binding proteins: Essential factors for initiating translation. *Cell* **40**, 223–224.
- Shaw G., Kamen R. (1986). A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* **46**, 659–667.
- Showman R. M., Wells D. E., Anstrom J., Hursh D. A., Raff R. A. (1982). Message-specific sequestration of maternal histone mRNA in the sea urchin egg. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 5944–5947.
- Shyne-Athwal S., Riccio R. P., Chakraborty G., Ingolia N. A. (1986). Protein modification by amino acid addition is increased in crushed sciatic but not optic nerves. *Science* **231**, 603–607.
- Sierra J. M., de Haro C., Datta A., Ochoa S. (1977). Translational control by protein kinases in *Artemia salina* and wheat germ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 4356–4359.
- Skoultschi A., Gross P. R. (1973). Maternal histone messenger

- RNA: Detection by molecular hybridization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **70**, 2840–2844.
- Sly W.S., Fischer H.D., Gonzales-Noriega A., Grubb J.H., Natowicz M. (1981). Role of the 6-phosphomannosyl-enzyme receptor in intracellular transport and adsorptive pinocytosis of lysosomal enzymes. Methods Cell Biol. **23**, 191–214.
- Smith L.D., Ecker R.C. (1965). Protein synthesis in enucleated eggs of *Rana pipiens*. Science **150**, 777–779.
- Soffer R.L. (1980). Biochemistry and biology of aminoacyl-transfer RNA-protein transferases. In: D. Soll, J. N. Abelson and P.R. Schimmel (eds.), Transfer RNA: Biological Aspects. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, pp. 493–505.
- Spirin A.S. (1966). On "masked" forms of messenger RNA in early embryogenesis and in other differentiating systems. Curr. Top. Dev. Biol. **1**, 1–38.
- Standart N., Hunt T., Ruderman J.V. (1986). Differential accumulation of ribonucleotide reductase subunits in clam oocytes: The large subunit is stored as a polypeptide, the small subunit as untranslated mRNA. J. Cell Biol. **103**, 2129–2136.
- Swank R.T., Paigen K. (1973). Biochemical and genetic evidence for a macromolecular β -glucuronidase complex in microsomal membranes. J. Mol. Biol. **77**, 371–389.
- Swenson K.I., Farrell K.M., Ruderman J.V. (1986). The calm embryo protein cyclin A induces entry into M phase and the resumption of meiosis in *Xenopus* oocytes. Cell **47**, 861–870.
- Tennant D.H. (1914). The early influence of spermatozoa upon the characters of echinoid larva. Carnegie Inst. Wash. Publ. **182**, 127–138.
- Thomas N.S.B., Matts R.L., Levin D.H., London I.M. (1985). The 60S ribosomal subunit as a carrier of eukaryotic initiation factor 2 and the site of reversing factor activity during protein synthesis. J. Biol. Chem. **260**, 9860–9866.
- van Loon A.P.G.M., Brandli A.W., Schatz G. (1986). The presequence of two imported mitochondrial proteins contain information for intracellular and intramitochondrial sorting. Cell **44**, 801–812.
- van Loon A.P.G.M., Schatz G. (1987). Transport of protons into the mitochondrial intramembranous space: The "sorting" domain of cytochrome c_1 presequence is a stop-transfer sequence specific for the mitochondrial inner membrane. EMBO J. **6**, 2441–2448.
- Wagenaar E.B., Mazia D. (1978). The effect of emetine on the first cleavage division of the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. In: E. R. Dirksen, D. M. Prescott and L. F. Fox (eds.), Cell Reproduction: In Honor of Daniel Mazia. Academic, New York, pp. 539–545.
- Walter P., Blobel G. (1983). Subcellular distribution of signal recognition particle and 7SL-RNA determined with polypeptide-specific antibodies and complementary DNA probe. J. Cell Biol. **97**, 1693–1699.
- Weidmann M., Kurzchalia T.V., Hartmann E., Rapoport T.A. (1987). A signal sequence receptor in the endoplasmic reticulum membrane. Nature **328**, 830–833.
- Weir M.P., Kornberg T. (1985). Patterns of engrailed and fushi tarazu transcripts reveal novel intermediate stage of *Drosophila* segmentation. Nature **318**, 433–439.
- Wellem T.E., Josephs R. (1979). Crystallization of deoxyhemoglobin S by fiber alignment and fusion. J. Mol. Biol. **135**, 651–674.
- Wilt F.H. (1964). Ribonucleic acid synthesis during sea urchin embryogenesis. Dev. Biol. **9**, 299–313.
- Winkler M.M., Nelson E.M., Lashbrook C., Hershey J.W.B. (1985). Multiple levels of regulation of protein synthesis at fertilization in sea urchin eggs. Dev. Biol. **107**, 290–300.
- Winkler M.M., Steinhardt R.A. (1981). Activation of protein synthesis in a sea urchin cell-free system. Dev. Biol. **84**, 432–439.
- Woodland H.R., Ballantine J.E.M. (1980). Paternal gene expression in developing hybrid embryos of *Xenopus laevis* and *Xenopus borealis*. J. Embryol. Exp. Morphol. **60**, 359–372.
- Young E.M., Raff R.A. (1979). Messenger ribonucleoprotein particles in developing sea urchin embryos. Dev. Biol. **72**, 24–40.
- Zucker W.V., Schulman H.M. (1968). Stimulation of globin-chain initiation by hemin in the reticulocyte cell-free system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **59**, 582–589.

Оглавление

Часть II. Механизмы клеточной дифференцировки

Глава 7. Детерминация посредством цитоплазматической спецификации.

Перевод Г. М. Игнатъевой 5

Введение 5

Преформация и эпигенез 5

Французские тератологи 7

Цитоплазматическая спецификация у зародышей оболочников 8

Цитоплазматическая локализация у зародышей моллюсков 14

Дополнительные сведения и гипотезы 14

Внутриклеточная локализация и движения морфогенетических детерминантов 14

Детерминация у нематоды *Caenorhabditis elegans* 20

Цитоплазматическая локализация детерминантов половых клеток 24

Генетика цитоплазматических детерминантов у дрозофилы 30

Резюме 36

Литература 36

Глава 8. Прогрессивная детерминация.

Перевод Г. М. Игнатъевой 39

Введение 39

Август Вейсман: теория зародышевой плазмы 39

Вильгельм Ру: мозаичное развитие 40

Ганс Дриш: регуляционное развитие 41

Свен Герстадиус: потенциалы и градиенты в ооците 43

Ганс Шпеман: прогрессивная детерминация эмбриональных клеток 49

Ганс Шпеман и Гильда Мангольд: первичная эмбриональная индукция 52

Региональная специфичность индукции 53

Механизмы первичной эмбриональной индукции 56

Нейтральный индуктор как молекула, способная к диффузии 61

Компетенция и вторичная индукция 61

Литература 63

Глава 9. Тожество геномов и дифференциальная экспрессия генов: эмбриологические исследования. Перевод Г. М. Игнатъевой 65

Введение 65

Тожество геномов 65

Клонирование у амфибий: ограничение потенциалов клеток 71

Клонирование у амфибий: исключения из ограничения потенциалов	74
Дополнительные сведения и гипотезы	76
Клонирование	76
Литература	79

Глава 10. Тожество геномов и дифференциальная экспрессия генов: молекулярные исследования. Перевод В. С. Михайлова 80

Введение 80

Методы молекулярной биологии 80

Дополнительные сведения и гипотезы 85

Когда ген клонирован 85

Дифференциальная экспрессия генов 92

Дополнительные сведения и гипотезы 99

Изменения генов 99

Резюме 107

Литература 107

Глава 11. Регуляция экспрессии генов на уровне транскрипции: изменение транскрипции в ходе развития. Перевод В. С. Михайлова 109

Введение 109

Гетерохроматин 110

Дополнительные сведения и гипотезы 114

Определение времени инактивации X-хромосомы 114

Амплифицированные гены 114

Дополнительные сведения и гипотезы 119

Молекулярная основа быстрой транскрипции рибосомных генов 119

Селективная транскрипция генов 120

Белок-регулятор транскрипции: контроль генов 5S-rPHK 127

Контроль детерминации на уровне транскрипции: гены переключения путей дифференцировки дочерних клеток 130

Дополнительные сведения и гипотезы 132

Детерминация клеток вульвы у *Caenorhabditis elegans* 132

Резюме 134

Литература 134

Глава 12. Регуляция экспрессии генов на уровне транскрипции: механизмы дифференциальной транскрипции генов. Перевод В. С. Михайлова 137

Эукариотические гены, кодирующие белки 137

Экзоны и интроны 137

Структура и функция промотора 141

Структура и функция энхансеров 144

Транскрипция генов легких цепей иммуноглобулинов 151

Дополнительные сведения и гипотезы	154	Образование 3'-конца РНК	194
Модульные гены	154	Транспорт из ядра	195
Метилирование ДНК	155	Резюме	196
Дополнительные сведения и гипотезы	158	Литература	196
Определение сайтов метилирования	158	Глава 14. Трансляционная и посттран-	
Хроматин эукариот	159	ляционная регуляция процессов раз-	
Нуклеосомы	159	вития. Перевод В. С. Михайлова	199
Активация репрессированного хроматина	162	Трансляционная регуляция развития	199
Связь активной ДНК с ядерным матриксом	167	Механизм трансляции у эукариот	199
Резюме	171	Контроль на уровне трансляции при координи-	
Литература	172	рованном синтезе белка: продукция гемогло-	
Глава 13. Контроль развития на уровне		бина	202
процессинга РНК. Перевод В. С. Михай-		Селективная деградация мРНК	204
лова	177	Трансляционный контроль ооцитных мРНК	206
Введение	177	Дополнительные сведения и гипотезы	216
Гетерогенная ядерная РНК	177	Активация генома зародыша	216
Сложность ядерной и цитоплазматической РНК	178	Гормональная стабилизация специфических	
Контроль развития на уровне процессинга		мРНК	217
яРНК	180	Широкая распространенность контроля на уров-	
Дополнительные сведения и гипотезы	183	не трансляции	218
Механизмы специфического процессинга ядерных		Посттрансляционная регуляция экспрессии генов	219
РНК	183	Посттрансляционная активация белков	219
Присутствие в ядре предшественников мРНК,		Инактивация белков при посттрансляционных	
не прошедших процессинг	185	модификациях	221
Образование альтернативных белков на одном		Субклеточная компартментализация белков с	
гене: дифференциальный процессинг РНК в		помощью посттрансляционных модификаций:	
иммунной системе	186	адресование белков в мембраны и лизосомы	224
Дифференциальный процессинг РНК: генерация		Адресование белков в ядра и митохондрии	225
новых белков в разных клетках в разное		Надмолекулярная сборка	226
время	188	Коллаген: конспект посттрансляционной регу-	
Дополнительные сведения и гипотезы	190	ляции	228
Биохимия процессинга РНК	190	Литература	230

Учебное издание

Скотт Ф. Гилберт

БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ

В 3-х томах

Том 2

Заведующая редакцией

канд. биол. наук М. Д. Гроздова

Ведущий редактор М. Б. Николаева

Редактор И. А. Ермакова

Художник А. Е. Волков

Художественные редакторы Н. М. Иванов, Л. М. Аленичева

Технический редактор М. А. Страшинова

Корректор И. А. Дериколенко

ИБ № 7425

Лицензия Л. Р. № 010174 от 22.01.92.

Сдано в набор 15.01.92. Подписано к печати 05.08.94.

Формат 84 × 108¹/₁₆. Бумага офсетная. Печать офсетная.

Гарнитура таймс.

Объем 7,50 бум. л. Усл. печ. л. 25,20. Усл. кр.-отт. 27,72.

Уч.-изд. л. 28,00.

Изд. № 4/7637. Тираж 7000 экз. Зак. 1246.

Издательство «Мир»

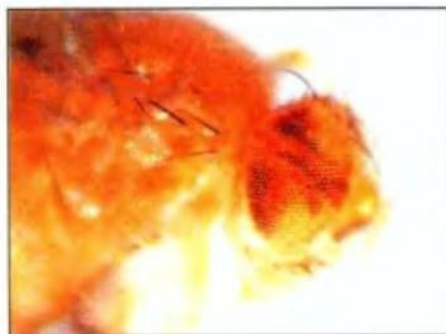
Комитета Российской Федерации по печати

129820, ГСП, Москва, 1-й Рижский пер., 2.

Можайский полиграфкомбинат

Комитета Российской Федерации по печати

143200, г. Можайск, ул. Мира, 93.

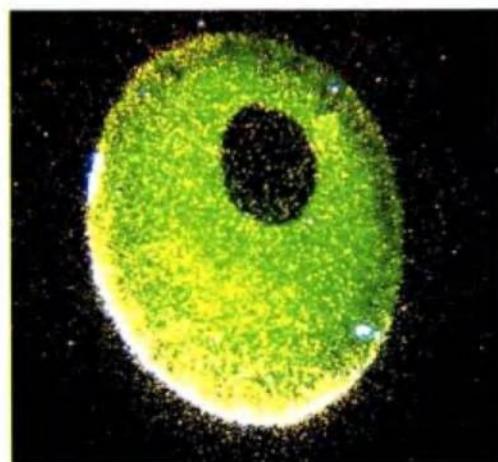


Данные, свидетельствующие о динамичности генома

Мозаичная структура глаза у дрозофилы сформировалась в результате спонтанного удаления участка ДНК (транспозона), который находился в гене, контролирующем синтез пигмента в клетках, дающих начало глазу. Белые участки образованы клетками, сохраняющими транспозон, тогда как красные клетки способны синтезировать пигмент, поскольку вызывающий мутацию транспозон удален из гена, кодирующего синтез пигмента. Глава 10. (Фотографии с любезного разрешения G. M. Rubin.)

Локализация специфических мРНК в яйце

Bg1 мРНК, кодирующие белок, подобный фактору роста, обнаружены с помощью метода гибридизации *in situ* только в вегетативной области яйца *Xenopus*. Белый серп, локализующийся внизу по периферии яйца, обусловлен радиоактивностью зонда, узнающего мРНК; остальная цитоплазма окрашена красителем Гимза. Главы 7, 8, 14. (Фотография с любезного разрешения D. A. Melton.)



Мыши, имеющие по шесть родителей

Эти разноцветные мыши были получены в результате смешивания клеток трех зародышей, находящихся на 4-клеточной стадии. Каждый из зародышей имел двух родителей: двух черных, двух белых и двух бурых. При этом трехголовых монстров не возникло, а образовывалась одна мышь (нормальных размеров), в развитие которой внесли вклад все три зародыша. У гибридной мыши образуются половые клетки трех типов. Об этом свидетельствует тот факт, что от скрещивания химерной мыши с рецессивной (белой) мышью были получены белые, черные, бурые и пятнистые потомки (показанные на фотографии). Глава 8. (Фотографии с любезного разрешения C. Markert.)



Активация энхансером тканеспецифической транскрипции

Энхансеры представляют собой участки ДНК, которые позволяют соседним генам экспрессироваться в соответствующее время и в соответствующей ткани. Если ген бактериальной β-галактозидазы помещают сразу после энхансера, обеспечивающего транскрипцию какого-либо гена в жировом теле самки, то бактериальный ген активируется в жировых телах (но не в других органах самки) (справа) и не активируется у самца (слева); это продемонстрировано с помощью окрашивания, специфического для β-галактозидазы (A). Окрашивания не наблюдается, если энхансер помещают не по соседству с β-галактозидазным геном (B) или если какие-либо другие ДНК замещают энхансер (B). Глава 12. (Фотографии с любезного разрешения P. Wensink.)

3710
6500

Том теперь — великий муж науки... и знает обо всем, кроме того, почему куриное яйцо не превращается в крокодила.

Ч. Кингсли, 1863

Изучая период дробления, мы приближаемся к источнику, дающему начало прогрессивно разветвляющимся потокам дифференцировок, которые завершаются в конце концов почти тихими заводами — индивидуальными клетками взрослого организма

Э. Джаст, 1939